

ORSAY

SERIE A

N° D'ORDRE 779

THESE

PRESENTEE A

LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Christiane POUPAT

Contribution à l'étude chimique et biogénétique des
alcaloïdes de la Monnaie du pape,

LUNARIA BIENNIS MOENCH, Crucifères.

SOUTENUE LE 17 MAI 1971 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM. M. FETIZON

PRESIDENT

H. KAGAN

M-M. JANOT

P. POTIER

EXAMINATEURS

ORSAY

SERIE A

N° D'ORDRE 779

THESE

PRESENTEE A

LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY
UNIVERSITE DE PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Christiane **POUPAT**

Contribution à l'étude chimique et biogénétique des
alcaloïdes de la Monnaie du pape,

LUNARIA BIENNIS MOENCH, Crucifères.

SOUTENUE LE 17 MAI 1971 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM. M. FETIZON

PRESIDENT

H. KAGAN

M-M. JANOT

P. POTIER

EXAMINATEURS



A MONSIEUR MARCEL FETIZON

Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay

qui m'a fait l'honneur de présider
le jury de cette thèse

A MONSIEUR MAURICE-MARIE JANOT

Membre de l'Institut

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

A MONSIEUR HENRI KAGAN

Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay

A MONSIEUR PIERRE POTIER

Maître de Recherche au Centre National
de la Recherche Scientifique

qui ont accepté de juger ce travail

En hommage de respectueuse gratitude.

A MONSIEUR MAURICE-MARIE JANOT

Membre de l'Académie des Sciences
Membre de l'Académie Nationale de Médecine
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
Directeur de l'Institut de Chimie des Substances
Naturelles du Centre National de la Recherche
Scientifique

qui m'a fait l'honneur de m'accueillir
dans son laboratoire et m'a prodigué
tant de marques d'intérêt

En hommage de profonde reconnaissance et de respectueux attachement.

A MONSIEUR PIERRE POTIER

Maître de Recherche au C. N. R. S.

qui m'a confié le sujet de ce travail
et m'a conseillée et dirigée tout au
long de sa réalisation

En témoignage d'amitié et de reconnaissance.

A MONSIEUR HENRI-PHILIPPE HUSSON

Chargé de Recherche au C.N.R.S.

qui m'a fait profiter de sa grande
connaissance des problèmes chimiques
et m'a prodigué d'efficaces conseils

En témoignage de gratitude.

A MES PARENTS

En témoignage de reconnaissance et de profonde affection.

INTRODUCTION

L'apparition de nouvelles méthodes physiques, de plus en plus précises, a fait subir à la chimie des substances d'origine naturelle une évolution qui lui permet de rester l'un des domaines les plus féconds de la chimie organique.

L'analyse structurale, bien entendu indispensable, n'est plus, cependant, qu'une étape sur la voie de la connaissance de ces substances. En effet, l'élucidation d'une structure fournit au chimiste des données qui peuvent lui permettre de suivre la biosynthèse de la substance avant d'essayer de la reproduire à son tour, par la synthèse.

Parmi les substances d'origine végétale, les alcaloïdes ont suscité et suscitent encore l'intérêt des chimistes dans ces domaines.

Les travaux qui font l'objet de cette thèse ont porté sur les alcaloïdes de la lunaire bisannuelle : Lunaria biennis Moench (Crucifères).

Le plan adopté pour l'exposé sera le suivant :

	Page
I GENERALITES - RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS	5
II COMPLEMENTS A L'ETUDE CHIMIQUE DE LA LUNARINE ET DE SES DERIVES	9
A - Réduction chimique de la lunarine - Stéréochimie des lunarinols	11
B - Isomérisation	20
C - Hydrogénation catalytique	29
D - Acétylation	34
E - Méthylation	37
III ISOLEMENT ET ETUDE STRUCTURALE DE TROIS NOUVEAUX ALCALOIDES	41
IV ETUDE STRUCTURALE DE LA LUNARIDINE ET DE LA NUMISMINE	47
Fragmentation de dérivés de la lunarine et de la lunaridine en spectrométrie de masse	54
V ETUDE BIOGENETIQUE DE LA LUNARINE	59
VI DEGRADATIONS DES PRINCIPAUX ALCALOIDES DE LA LUNAIRE	71
VII SYNTHÈSE DES ALCALOIDES TETRAHYDROGENES DE LA LUNAIRE	75
CONCLUSION	83
PARTIE EXPERIMENTALE	85
BIBLIOGRAPHIE	123

Avant de commencer cet exposé, je tiens à remercier :

- Le Centre National de la Recherche Scientifique pour la réalisation matérielle de cette thèse ;
- Monsieur le Professeur J. POISSON qui a accepté de me parrainer auprès de cet Organisme ;
- Monsieur le Professeur A.R. BATTERSBY (Université de Cambridge, Grande-Bretagne) qui m'a accueillie dans son laboratoire pour un fructueux séjour ;
- Monsieur G. MOREL, Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Agronomique ;
- Monsieur A. HOREAU, Professeur au Collège de France ;
- Messieurs A. CAVE et M. LEBŒUF, qui m'ont initiée à la chimie végétale ;
- Monsieur G. KUNESCH qui m'a fait amicalement bénéficier de sa connaissance des problèmes biogénétiques ;
- Monsieur P. BLADON (Université de Strathclyde, Glasgow, Ecosse) pour la réalisation des spectres de masse à haute résolution ;
- Monsieur B.C. DAS pour l'interprétation des spectres de masse et de fructueuses discussions ;
- Madame C. KAN-FAN, Mesdemoiselles J. MORON et M. COLIN (Gif), R. NOUAILLE (Paris)
Messieurs B. RODRIGUEZ, Y. LANGLOIS, A.B. CAVE, T. IMBERT (Gif), D. LAING et P.J. WILLIAMS (Cambridge) pour l'aide amicale qu'ils m'ont apportée ;
- Mesdames L. ALAIS et A. KORNPROBST pour la réalisation des spectres de RMN ;
- Monsieur A. GAUDEMER pour l'enregistrement du spectre de RMN sur appareil HR-220 Varian ;
- Monsieur J.P. COSSON et le service de spectrométrie de masse pour la réalisation des spectres ;
- Madame F. PICOT pour l'enregistrement des courbes de dichroïsme circulaire et de certains spectres IR et UV ;
- Le service de Microanalyse du C.N.R.S.

Mes remerciements vont également aux membres du service du Professeur M.-M. JANOT à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles à Gif et, en particulier à ceux qui ont été ou sont encore mes collègues directs :

Mesdames M.M. BENOIT, A.M. BUI, A.M. CHEVOLOT, A. HUSSON, N. LANGLOIS, M.T. LE GOFF, D. PAPACOSTA, C. OUANNES, M. WODOCIONG ;
Messieurs A. AHOND, R. BEUGELMANS, L. CHEVOLOT, H. COMPAIGNON de MARCHEVILLE, C. DIENG, D. GUENARD, L. FERNANDES, F. LE GOFFIC, M. LOUNASMAA, G. MASSIOT, Y. PEPIN, J. PUSSET, P. RASOANAIVO, J. de ROSTOLAN, G. ROUSSI, T. SEVENET, C. THAL, J.P. VERMES.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS RAPPEL DES TRAVAUX ANTÉRIEURS

Le genre *Lunaria* appartient à la famille des Crucifères. Il comprend des espèces annuelle, bisannuelle et vivace :

Lunaria annua L.
Lunaria biennis Moench
Lunaria rediviva L.

La lunaire bisannuelle, que nous avons étudiée, est une plante ornementale, herbacée, subspontanée en Europe.

Ses fleurs sont violettes ou purpurines : elles apparaissent en mai-juin et donnent naissance à de grandes silicules, très aplaties, renfermant 4 à 8 graines brunes, discoïdes, ailées.

A la maturité, après la chute des valves et des graines, seule la cloison médiane persiste : mince, de consistance papyracée, d'un blanc satiné, elle explique les appellations vulgaires de la plante : monnaie du pape, herbe-aux-écus, satinée, satin blanc, passe-satin.

La présence d'alcaloïdes dans cette plante fut décelée, en premier lieu, en 1908, par E. REEB ^(1,2) qui isola une substance cristallisée à laquelle il donna le nom de lunarine.

En 1909, E. HAIRES (3,4,5) séparait également la lunarine. D'autre part, quelques recherches furent entreprises pour préciser la nature du ou des hétérosides soufrés assez communs dans les graines de Crucifères. Une génine fut ainsi identifiée à l'isothiocyanate d'isopropyle (6).

G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN (7) ont étudié la répartition du bore dans différentes graines, dont celles de la lunaire.

Plus récemment, O. LARSEN (22,23,24) a étudié les acides aminés et les dérivés γ -glutamiques dans les graines de la lunaire annuelle.

K.L. MIKOLAJCZAK et coll. (25), puis R.D. HARLOW et coll. (26) se sont intéressés à la nature de l'huile contenue dans cette plante.

Enfin, C.H. VANETTEN et R.W. MILLER (49) ont signalé la présence, dans les graines de l'espèce annuelle, d'acide diamino- α , γ -butyrique.

Cependant, les recherches les plus nombreuses portent sur les alcaloïdes présents dans les graines : en effet, elles sont seules suffisamment riches en alcaloïdes pour permettre une extraction.

Après E. REEB et E. HAIRES, E. STEINEGGER et T. REICHSTEIN (8), à la recherche d'hétérosides cardiotoniques, isolent en 1947 une lunarine à laquelle ils attribuent la formule $C_{19}H_{26}O_4N_2$. La même année, O.R. HANSEN (9) propose la formule $C_{25}H_{33}O_5N_3$ et, en 1954, H.G. BOIT (10) précise que la molécule de lunarine possède une molécule d'eau de cristallisation et qu'elle répond à la formule $C_{25}H_{31}O_4N_3 \cdot H_2O$. Il indique, en même temps, la présence d'un deuxième alcaloïde cristallisé, isomère de la lunarine : la lunaridine.

Puis, en 1956, M.-M. JANOT et J. LE MEN (11), après avoir précisé certaines constantes physico-chimiques de la lunarine et de la lunaridine, signalent la présence d'un troisième alcaloïde cristallisé pour lequel ils proposent le nom de lunariamine et auquel ils attribuent la formule $C_{24}H_{33}O_4N_3$.

En 1959, P. POTIER, J. LE MEN et M.-M. JANOT (12) isolent un quatrième alcaloïde, la numismine, répondant à la formule $C_{25}H_{33}O_4N_3$.

En 1962, S. HUNECK (29) retrouve la lunariamine, ainsi que la lunarine, dans l'espèce vivace Lunaria rediviva L.

Aux quatre alcaloïdes ainsi isolés (50), s'en ajoutent maintenant trois autres que nous avons récemment séparés (13) et dénommés LBX, LBY et LBZ. Ils répondent respectivement aux formules $C_{26}H_{31}O_4N_3$, $C_{25}H_{33}O_4N_3 \cdot 2 H_2O$ et $C_{26}H_{33}O_4N_3$ et feront l'objet d'un développement ultérieur.

E. STEINEGGER, T. REICHSTEIN (8) et O.R. HANSEN (9) sont les premiers, en 1947, à fournir des résultats intéressants sur la structure chimique de la lunarine.

H.G. BOIT (10) confirme leurs résultats en 1954.

En 1956, M.-M. JANOT et J. LE MEN, en précisant certaines constantes physico-chimiques, notamment en spectrographie UV et IR, complètent les connaissances acquises.

En 1959, P. POTIER et J. LE MEN ⁽¹⁴⁾ d'une part, P. BLADON, R. IKAN, F.S. SPRING et A.D. TAIT ⁽¹⁵⁾ d'autre part, publient une étude chimique détaillée de la lunarine sans toutefois conclure à une structure précise.

En 1960, P. POTIER, J. LE MEN, M.-M. JANOT et P. BLADON ⁽¹⁶⁾ font état de l'isolement de la spermidine, par dégradation de la lunarine et, l'année suivante, de dérivés diphenyliques. La même année, P. POTIER ⁽¹⁷⁾ publie un ensemble de résultats, prélude à la première structure proposée par P. POTIER, J. LE MEN, M.-M. JANOT, P. BLADON, A.G. BROWN et C.S. WILSON ⁽¹⁸⁾ en 1963.

Seule l'étude par les rayons X, entreprise parallèlement par C. TAMURA, G.A. SIM et J.A.D. JEFFREYS, P. BLADON, G. FERGUSON ⁽¹⁹⁾ permettra, en 1965, de corriger la structure précédemment proposée.

Tout récemment, E.W. WARNHOFF a passé en revue l'ensemble des résultats obtenus sur les alcaloïdes de la lunaire ⁽²⁸⁾.

Enfin, il résulte de deux nouvelles publications, une modification dans la configuration absolue jusqu'alors admise de la molécule de lunarine ^(20,21).

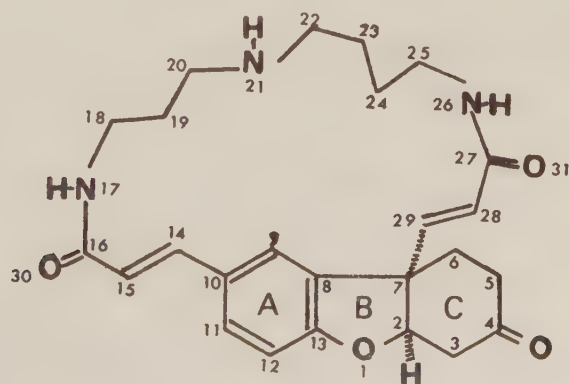
CHAPITRE II

COMPLÉMENTS A L'ÉTUDE CHIMIQUE DE LA LUNARINE
ET DE SES DÉRIVÉS

L'étude chimique de la lunarine a été reprise afin de préciser certaines données spectrographiques, notamment en spectrographie de résonance magnétique nucléaire et de masse.

La préparation de divers composés nécessaires à ces études a conduit à certaines observations qui sont rapportées plus loin.

La structure exacte de la lunarine, 1, a été déterminée grâce à l'utilisation des spectres de diffraction par les rayons X (19, 20, 21).



Elle contient une chaîne spermidine dans laquelle les atomes d'azote terminaux sont amidifiés par deux restes p.-hydroxycinnamiques constituant un système céto-4 hexahydrodibenzofuranne.

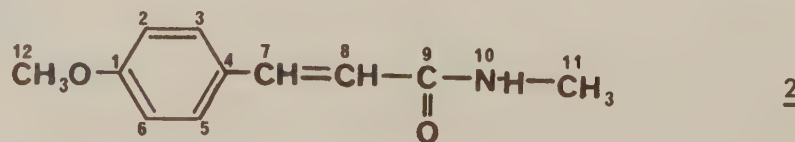
La jonction des cycles B et C est cis, les hydrogènes éthyléniques portés par les C-14, 15 et 28, 29 sont en position trans, le cycle C cyclohexanone a une conformation "bateau croisé".

Une première interprétation du spectre de résonance magnétique nucléaire a été donnée par P. POTIER et coll. (18), mais elle reposait sur une structure inexacte. Il a paru intéressant de la reprendre, compte tenu des nouvelles données structurales.

Le spectre de RMN de la lunarine est difficilement interprétable dans la zone s'étendant entre 0 et 4ppm ; la zone entre 4 et 9ppm peut être interprétée ainsi :

- à 5,08ppm, un triplet correspondant à 1 proton, attribué au proton porté par le C-2 ;
- deux doublets centrés l'un sur 6,03ppm, l'autre sur 7,52ppm correspondent aux signaux de résonance des protons cinnamiques portés par les C-15 et 14 : la constante de couplage $J = 15,5\text{cps}$ en confirme le caractère trans. La proximité du noyau aromatique justifie le déplacement vers les champs faibles du proton 14.
- deux doublets centrés, l'un sur 6,2 ppm, l'autre sur 7,07ppm représentent les protons éthyléniques portés par les C-28 et 29. Leur constante de couplage est la même que ci-dessus : $J = 15,5\text{cps}$.
- les protons benzéniques sont représentés par :
 - un singulet pour le proton en 9, résonnant à 7,22ppm ;
 - deux doublets centrés sur 7,14 et 6,73ppm pour les protons 11 et 12 : leur constante de couplage $J = 9\text{cps}$ est caractéristique de protons benzéniques en position ortho.
- un proton supplémentaire apparaît dans la même zone que les protons benzéniques et éthyléniques : il s'agit du proton porté par l'N amidique 26 qui résonne à 6,40ppm.
- enfin, le proton porté par l'autre azote amidique, en 17, apparaît sous forme d'un multiplet centré sur 8,96ppm. L'enchaînement cinnamamide ne suffit sans doute pas pour expliquer le fort déplacement du signal de ce proton vers les champs faibles (figure 1).

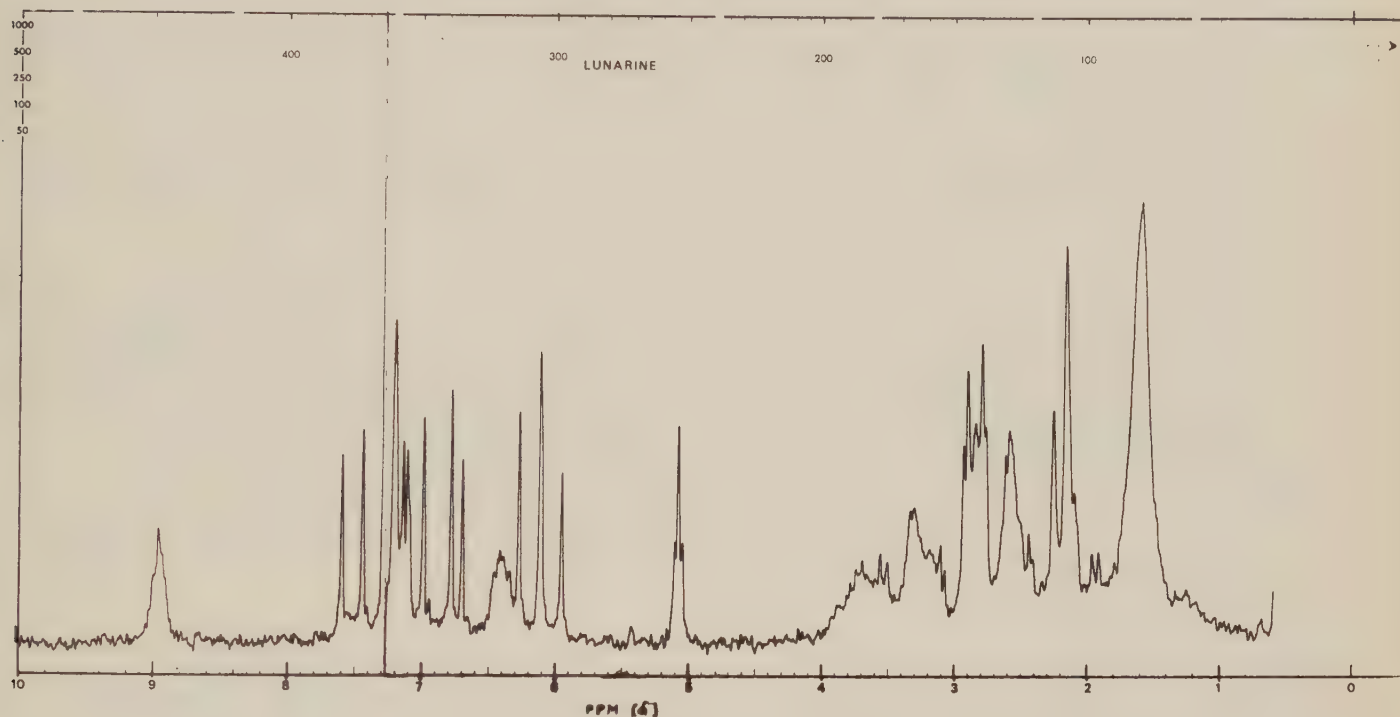
A titre de comparaison, nous avons préparé l'amide de la méthylamine et de l'acide p.-méthoxycinnamique, 2



Le proton porté par l'N apparaît sous forme d'un multiplet centré à 7,16ppm qui disparaît par deutériation.

Il semble que, dans le cas de la lunarine, une liaison hydrogène entre le doublet du N-21 et le proton porté par N-17 soit à l'origine de l'importance du déplacement observé ; il semble raisonnable de penser que cette liaison est facilitée de ce côté-ci de la molécule puisqu'elle donne naissance à un cycle hexagonal, plus favorable que le cycle heptagonal qui se formerait si cette liaison se faisait entre N-21 et N-26.

Figure 1



Ce spectre a été enregistré sur appareil XL-100-12 Varian

A partir de ces données, l'étude des spectres de RMN des divers composés préparés à partir de la lunarine a facilité l'interprétation des résultats obtenus au cours des réactions qui seront exposées maintenant :

- réduction chimique de la lunarine ;
- isomérisation ;
- hydrogénation ;
- acétylation ;
- méthylation.

A - REDUCTION CHIMIQUE DE LA LUNARINE

Elle a été réalisée selon un mode qui diffère assez peu de celui utilisé par P. POTIER ^(14, 17) et P. BLADON ⁽¹⁵⁾ : par le borohydrure de sodium en milieu méthanolique.

Les deux alcools épimères se forment dans les proportions de 85 à 90% pour le lunarinol I, 10 à 15% pour le lunarinol II. Ils sont séparés par chromatographie sur colonne d'alumine : le premier est élué par le chloroforme additionné de 2% d'éthanol, le second par le mélange chloroforme/éthanol 95/5.

• Le lunarinol I, 3, cristallise du mélange méthanol/éther, $F = 255-256^{\circ}\text{C}$;
 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 153^{\circ}$ (éthanol).

Il répond à la formule brute $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_3$.

Son spectre IR fait apparaître une bande OH (3440cm^{-1}), une bande NH (3290cm^{-1}), deux bandes amides (1660 et $1540-1560\text{cm}^{-1}$), une première bande d'insaturation éthylénique, plus ou moins confondue avec une bande aromatique ($1600-1620\text{cm}^{-1}$) et une autre à 970cm^{-1} (enregistré dans le nujol).

Son spectre UV possède trois maximums en milieu neutre : à 220, 298 et $319\text{m}\mu$. On ne note pas de déplacement significatif tant en milieu acide qu'en milieu alcalin.

Son spectre de RMN diffère fort peu de celui de la lunarine dans la zone comprise entre 4 et 9ppm. Deux faits sont cependant à noter : d'une part, le déplacement vers les champs forts du multiplet attribué au proton angulaire fixé sur le C-2 : de 5,06ppm dans la lunarine, il est centré sur 4,52ppm dans le lunarinol I ; d'autre part, l'apparition d'un multiplet centré sur 4,07ppm : correspondant à 1 proton, il a été attribué au proton porté par le même carbone que l'OH alcoolique (C-4) (planche 4).

La disparition de ce signal sur le spectre du lunarinol I deutérié (préparé comme le lunarinol I en remplaçant le borohydrure par le borodeutérure de sodium) confirme cette interprétation.

• Quant au lunarinol II, 4, il cristallise aussi du mélange éthanol/éther, $F = 270-272^{\circ}\text{C}$ avec décomposition, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 152^{\circ}$ (éthanol).

Son spectre IR présente une bande OH ($3430-3440\text{cm}^{-1}$), une bande NH ($3270-3290\text{cm}^{-1}$), deux bandes amides (1660 et 1550cm^{-1}), deux bandes d'insaturation éthylénique (1640 et 970cm^{-1}) (enregistré dans le nujol).

Son spectre UV possède 3 maximums en milieu neutre à 214, 296 et $316\text{m}\mu$ sans modification sensible en milieu acide ou en milieu alcalin, même fort (potasse éthanolique 2 N).

Son spectre de RMN (planche 5) est très voisin de celui du lunarinol I. Seule différence notable, le signal du proton porté par le C-4. Il résonne à 3,93ppm au lieu de 4,07ppm pour l'alcool épimère.

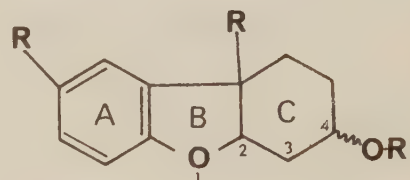
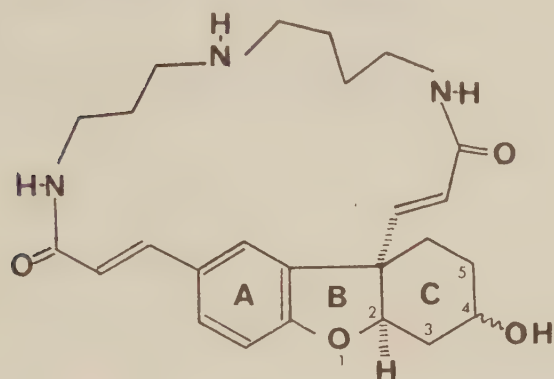
Comme pour le lunarinol I, ce signal disparaît sur le spectre du lunarinol II deutérié.

Il restait à déterminer la configuration de l'OH alcoolique dans les deux lunarinols.

Stéréochimie des lunarinols

La méthode de "dédoublage partiel" de A. HOREAU (33,34,35), mise en œuvre sur les dérivés N-acétylés des deux lunarinols, n'a pas donné de résultats significatifs en raison, sans doute, du manque d'encombrement net autour du groupe hydroxyle considéré.

La configuration des lunarinols I et II, 3 et 4, a finalement été déduite de l'examen des spectres de RMN de leurs dérivés et des analogues provenant de la cétone de Pummerer (44). L'interprétation des spectres de RMN des lunarinols eux-mêmes est difficile du fait de leur rapide isomérisation (vide infra).



- 3 Lunarinol I ; dérivé cis, cis
- 4 Lunarinol II ; dérivé cis, trans
- 5 Tétrahydrolunarinol I
- 6 Tétrahydrolunarinol II
- 7 N,O-diacétyltétrahydrolunarinol I
- 8 N,O-diacétyltétrahydrolunarinol II

- 9 R=Me ; R'=H ; dérivé cis, trans*
- 10 R=Me ; R'=H ; dérivé cis, cis
- 11 R=Me ; R'=Ac ; dérivé cis, trans
- 12 R=Me ; R'=Ac ; dérivé cis, cis
- 13 R=-(CH₂)₂COOMe ; R'=Ac ; dérivé cis,
trans
- 14 R=-(CH₂)₂COOMe ; R'=Ac ; dérivé cis,
cis

Les dérivés 9, 10, 11 et 12 ont été obtenus par action du borohydrure de sodium sur la cétone de Pummerer hydrogénée, suivie, pour les deux derniers, d'une acétylation par l'anhydride acétique dans la pyridine. Ces deux épimères n'avaient encore jamais été séparés.

Les dérivés 13 et 14 proviennent de la dégradation des lunarinols qui sera décrite plus loin (chapitre VI).

* - Cette nomenclature est basée sur les conventions de W.G. DAUBEN et E. HOERGER (55). Le terme souligné caractérise la jonction de cycle.

Planche 1

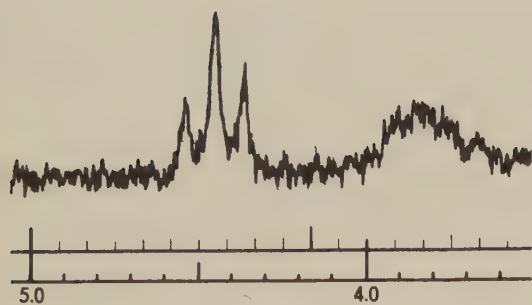
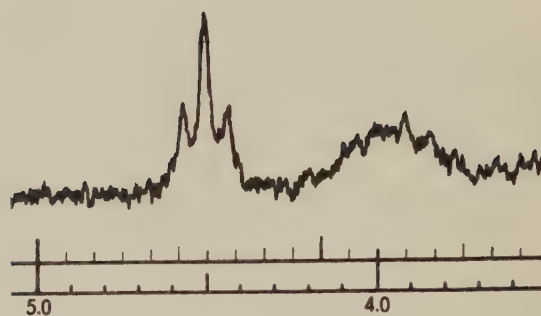
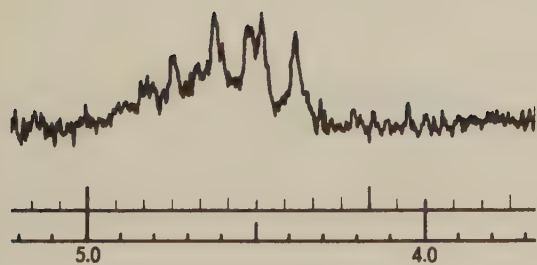
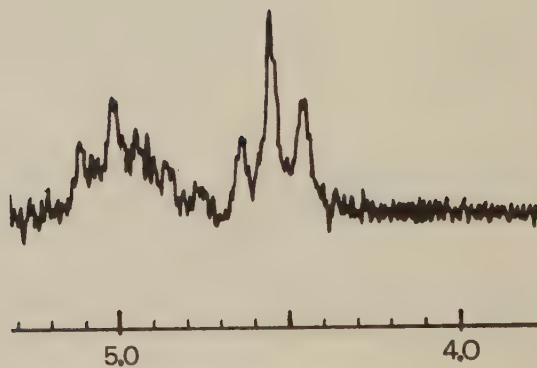
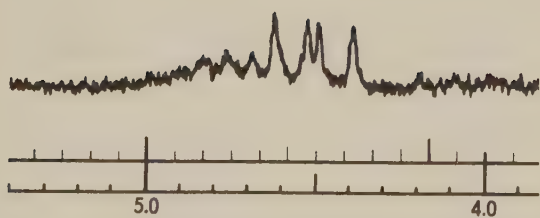
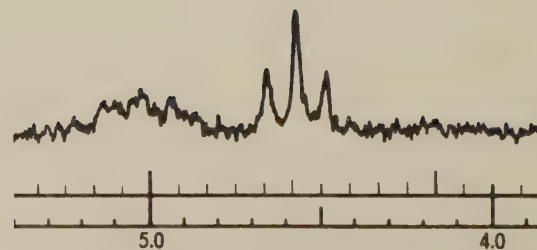
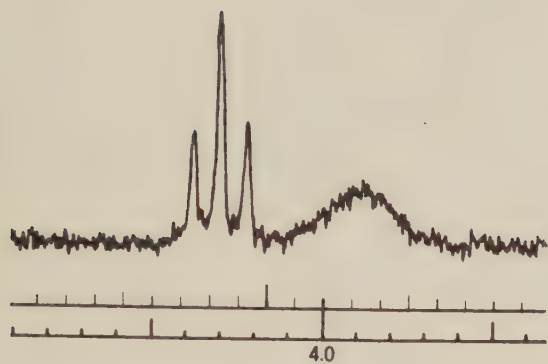
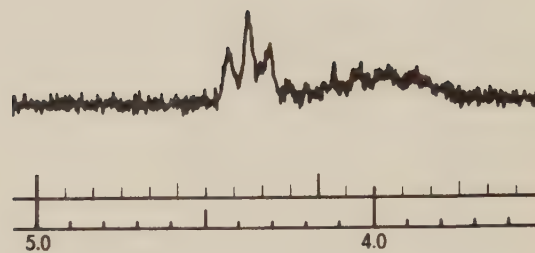
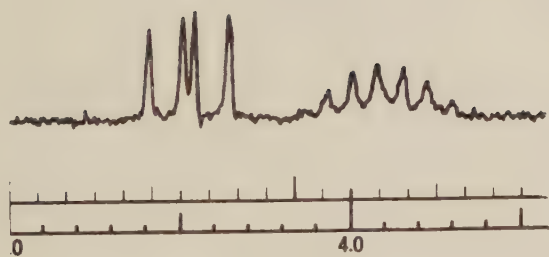
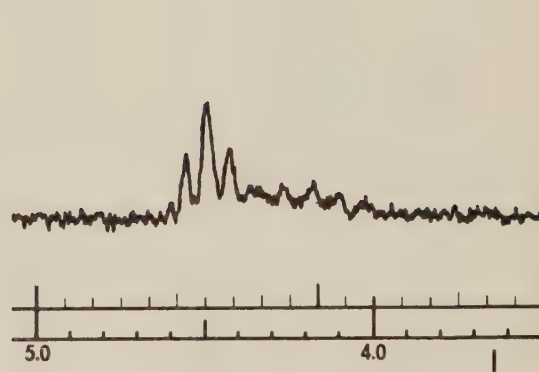
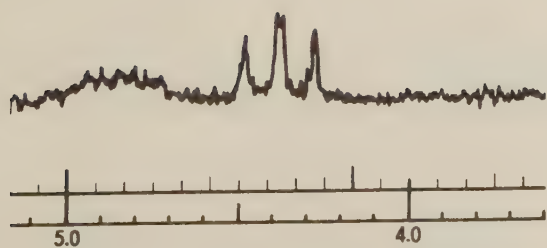
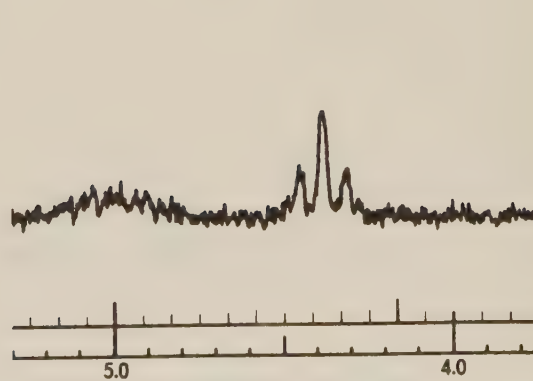
5 DANS CDCl_3 6 DANS CDCl_3 7 DANS CDCl_3 8 DANS CDCl_3 14 DANS CDCl_3 13 DANS CDCl_3

Planche 2

10 DANS CDCl_3 9 DANS CDCl_3 10 DANS $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 9 DANS $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ 12 DANS CDCl_3 11 DANS CDCl_3

• Les spectres de RMN des tétrahydrolunarinsols I, 5, et II, 6, et des alcools 9 et 10, enregistrés en solution chloroformique, font apparaître le proton angulaire en C-2 sous forme d'un triplet : les constantes de couplage avec les protons du méthylène en C-3 sont donc identiques (valeur moyenne = 4cps) et le proton en C-2 est approximativement bissecteur de l'angle formé par les deux protons du CH₂. Il est donc équatorial. Les conformations au niveau du C-4 ont été attribuées par observation de la somme des constantes de couplage (ΣJ) et des largeurs à mi-hauteur ($\Delta \frac{W}{2}$) des signaux H-C-OH de ces dérivés (56) (tableau I, planches 1 et 2) :
les alcools 5 et 10 sont axiaux et les alcools 6 et 9 équatoriaux.

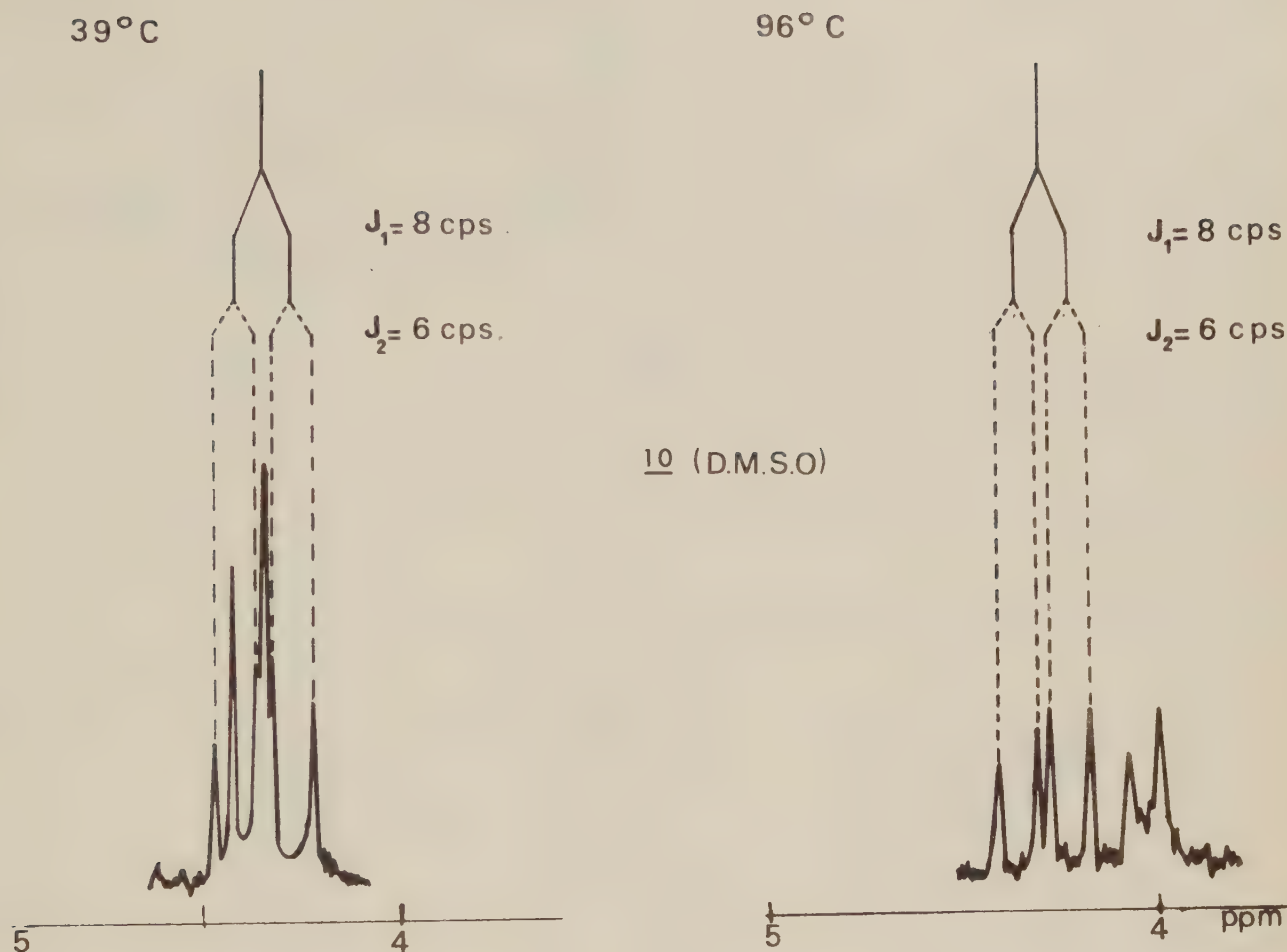
	Solvant	H porté par le C-2		H porté par le C-4			
				$\Delta \frac{W}{2}$ cps	ΣJ cps		
<u>5</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,46ppm J=5cps	<u>m</u> 3,85ppm	12		19
<u>6</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,50ppm J=4cps	<u>m</u> 3,95ppm	17		27
<u>7</u>	CDCl ₃	<u>q</u>	4,51ppm $\left\{ \begin{array}{l} J_1=8cps \\ J_2=6cps \end{array} \right.$	<u>m</u> 4,74ppm	17		28
<u>8</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,55ppm J=5cps	<u>m</u> 5 ppm	16,5		27
<u>9</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,36ppm J=3,5cps	<u>m</u> 3,97ppm	17		28
	C ₅ D ₅ N	<u>t</u>	4,48ppm J=4cps	<u>m</u> 4,23ppm	20		32
<u>10</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,30ppm J=4,5cps	<u>m</u> 3,87ppm	11		21
	C ₅ D ₅ N	<u>q</u>	4,46ppm $\left\{ \begin{array}{l} J_1=8cps \\ J_2=6cps \end{array} \right.$	<u>m</u> 3,91ppm	17,5		28
<u>11</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,37ppm J=4cps	<u>m</u> 4,98ppm	17,5		28
<u>12</u>	CDCl ₃	<u>q</u>	4,37ppm $\left\{ \begin{array}{l} J_1=7cps \\ J_2=5,5cps \end{array} \right.$	<u>m</u> 4,84ppm	16,5		27,5
<u>13</u>	CDCl ₃	<u>t</u>	4,56ppm J=5cps	<u>m</u> 5,02ppm	17		28
<u>14</u>	CDCl ₃	<u>q</u>	4,52ppm $\left\{ \begin{array}{l} J_1=8cps \\ J_2=6cps \end{array} \right.$	<u>m</u> 4,76ppm	17		29,5

TABLEAU I

• Sur les spectres de RMN des dérivés acétylés 7, 12, 14, enregistrés dans le deutériochloroforme et de l'alcool 10, enregistré dans la pyridine deutériée, on observe le proton en C-2 sous forme d'un quadruplet ($J_1=8cps$; $J_2=6cps$).

Sur le spectre de ce même alcool 10, enregistré dans le diméthylsulfoxyde deutérié, le signal du proton en C-2 est plus complexe, en raison de la présence d'un doublet dû au proton du groupement hydroxyle (58). L'enregistrement du spectre à une température supérieure à 80°C fait apparaître le même quadruplet pour le proton en C-2 (figure 2).

Figure 2



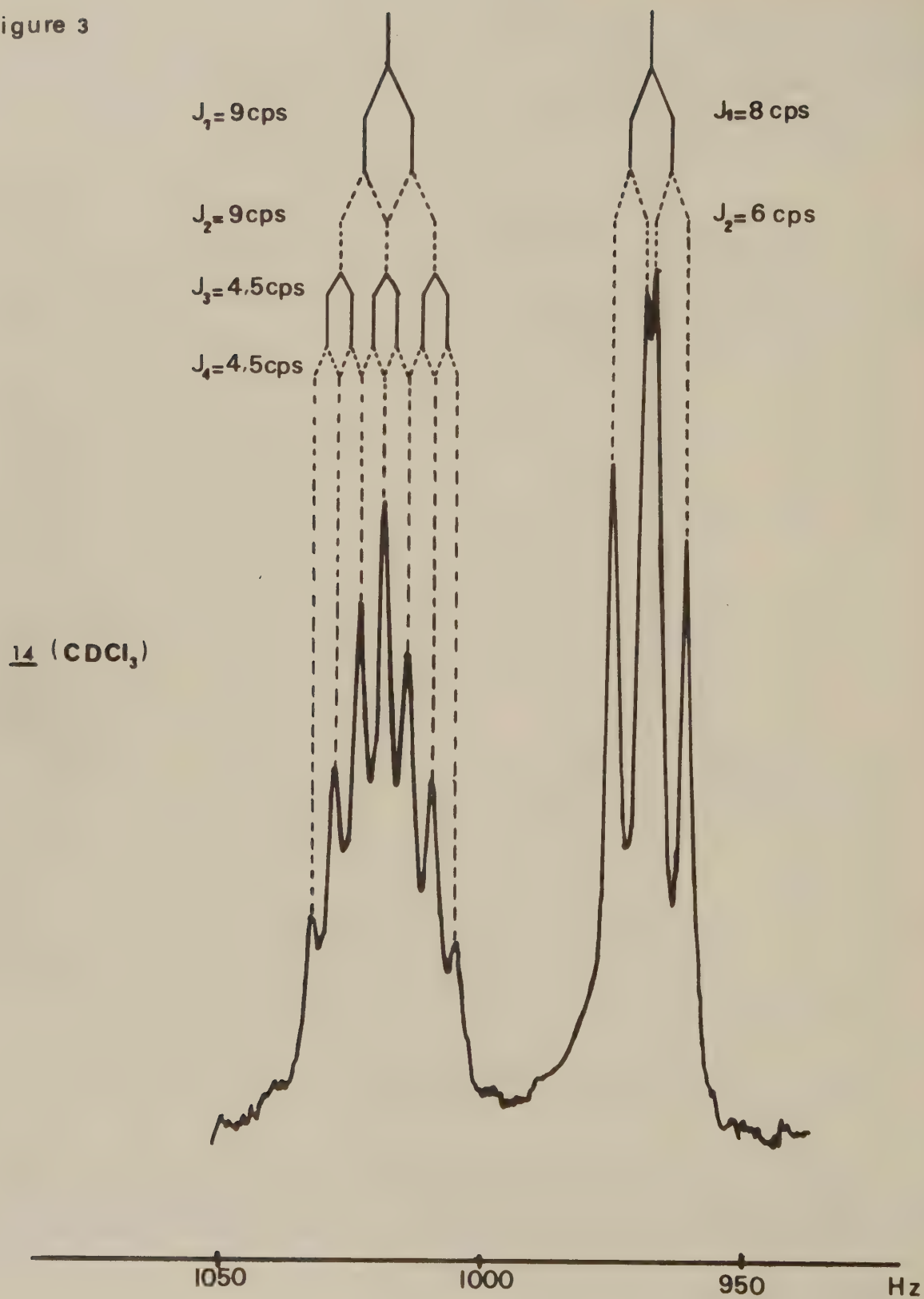
Le proton en C-2 est donc pseudo-axial.

De plus, d'équatorial, le proton jouxtant la fonction acétyle ou alcool devient axial (voir ΣJ et $\Delta \frac{W}{2}$; tableau I, planches 1 et 2).

Ces modifications sont particulièrement nettes sur le spectre du composé 14 enregistré sur appareil à 220 MHz (figure 3) :

- à côté du quadruplet du proton en C-2, on note la présence d'un heptuplet (H en C-4) ; la valeur des constantes de couplage $J_1 = 9$ cps ; $J_2 = 9$ cps ; $J_3 = 4,5$ cps ; $J_4 = 4,5$ cps, est caractéristique d'un proton axial couplant avec deux protons vicinaux équatoriaux (J_3 , J_4) et deux autres protons vicinaux axiaux (J_1 , J_2).

Figure 3



Ce spectre a été enregistré sur appareil HR-220 Varian

Par contre, les spectres de RMN des dérivés épimères 8, 11, 13 et 9, enregistrés dans les mêmes conditions, ne montrent pas de changement pour le proton en C-2.

Ces faits, apparemment contradictoires, s'expliquent par un changement de conformation du cycle cyclohexanique C.

Une certaine analogie existe entre les cycles B et C de ces différents dérivés tricycliques et les noyaux cis-perhydrindaniques. La fusion cis des cycles laisse une grande flexibilité au cycle hexagonal qui est figé dans une forme chaise indéformable dans les trans-perhydrindanes (⁵⁴).

Le seul examen des modèles de Dreiding permet d'écarter la possibilité d'une conformation bateau pour le cycle C en raison de l'encombrement stérique dû à la proximité des hydrogènes en C-3 et C-6 (situés à la proue et à la poupe du bateau). Dans le cas présent, huit des neuf atomes que comprennent les cycles A et B étant coplanaires, les deux formes chaises peuvent être légèrement déformées.

Cette situation facilite l'inversion d'une forme chaise dans l'autre en l'absence de toute interaction stérique.

L'existence de ce phénomène oblige à envisager deux conformations possibles C₁ et C₂ pour les dérivés de cette série tricyclique.



Dans la conformation C₁, le proton en C-2 est pseudo-axial en raison de la déformation de la forme chaise. La valeur moyenne des couplages de ce proton avec les protons du méthylène adjacent (C-3) sont de 8 et 6 cps. Dans cette conformation, le proton en C-2 apparaît donc sous forme d'un quadruplet (tableau I, planches 1 et 2).

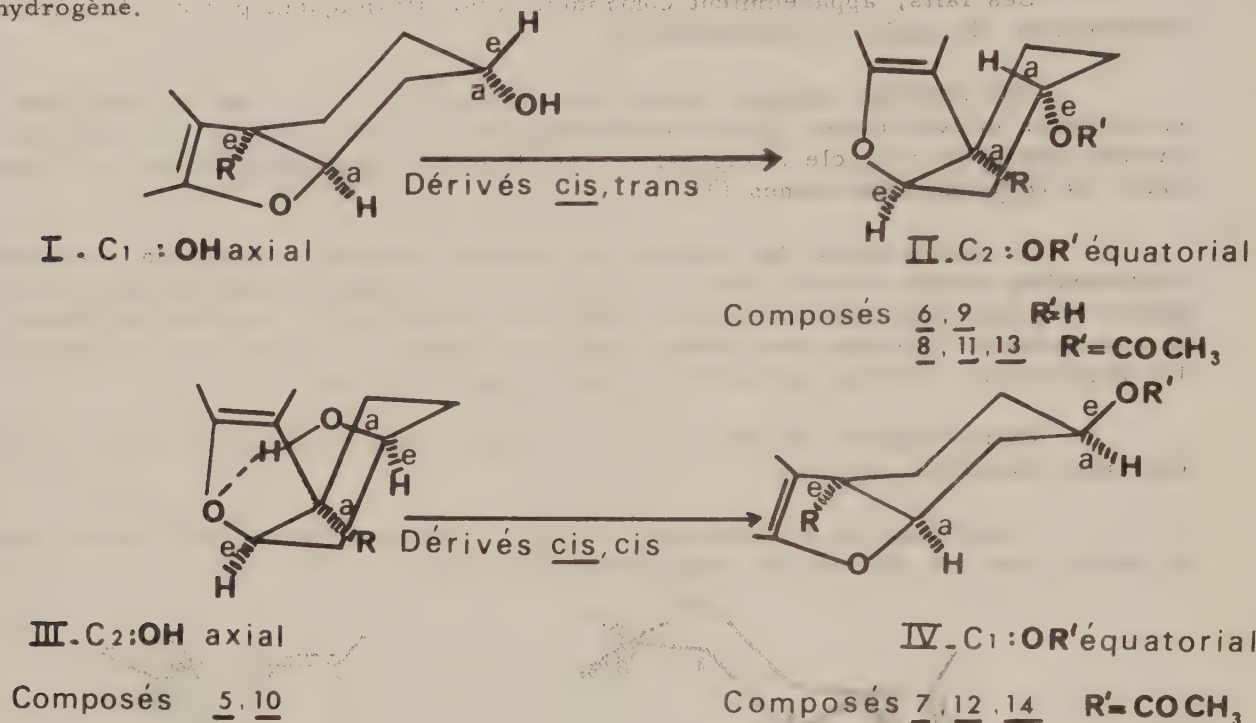
Dans la conformation C₂, le proton en C-2 est approximativement bissecteur de l'angle formé par les protons du méthylène (C-3) et les couplages sont identiques (valeur moyenne 4cps). Le proton en C-2 apparaît alors sous forme d'un triplet (tableau I, planches 1 et 2).

Il est ainsi possible, par la simple observation du proton en C-2, de connaître la conformation du cycle C dans les différents composés étudiés.

Dans la série cis, trans, la conformation II (alcool équatorial) est préférée.

En revanche, dans la série cis, cis, on remarque que les alcools existent dans la conformation III (alcool axial) ; cette conformation est stabilisée par une liaison hydrogène : sur le spectre IR du composé 10, enregistré en solution diluée (0,005 mole par litre) dans le tétrachlorure de carbone, une bande OH est visible à 3580cm⁻¹ (OH lié), qui apparaît à 3630cm⁻¹ (OH libre) sur le spectre du composé 9 (⁸⁹).

Ce même alcool, 10, en présence de pyridine⁽³²⁾ ou de diméthylsulfoxyde⁽⁵⁸⁾ ainsi que les dérivés O-acétylés, 7, 12 et 14, sont plus stables dans la conformation IV, c'est-à-dire avec le substituant en position équatoriale. L'engagement de l'OH dans un complexe avec le solvant (pyridine, diméthylsulfoxyde) rompt la liaison hydrogène.



Substituant axial ou équatorial, conformation III ou IV, les alcools majoritaires formés par réduction de la cétone correspondante par le borohydrure de sodium et leurs dérivés acétylés sont, dans la série de la lunarine, des alcools ou esters β , la configuration des substituants en C-2 et C-7 étant α .

B. ISOMERISATION DE LA LUNARINE ET DES LUNARINOLS

Lunarine et lunarinols subissent, en solution, une transformation. Mise en évidence grâce à la chromatographie sur couche mince, cette transformation est observée à température ambiante lorsque la lunarine et les lunarinols I et II sont mis en solution dans des solvants usuels tels que l'éthanol, neutre ou acide, le méthanol, le chloroforme.

La proportion du produit plus polaire formé à partir de chacun de ces composés augmente dans le temps jusqu'à atteindre, semble-t-il, un maximum.

Les mêmes essais, effectués sous courant d'azote, donnent les mêmes résultats.

La chromatographie sur colonne d'alumine n'a pas donné de résultats satisfaisants pour la séparation de ces produits.

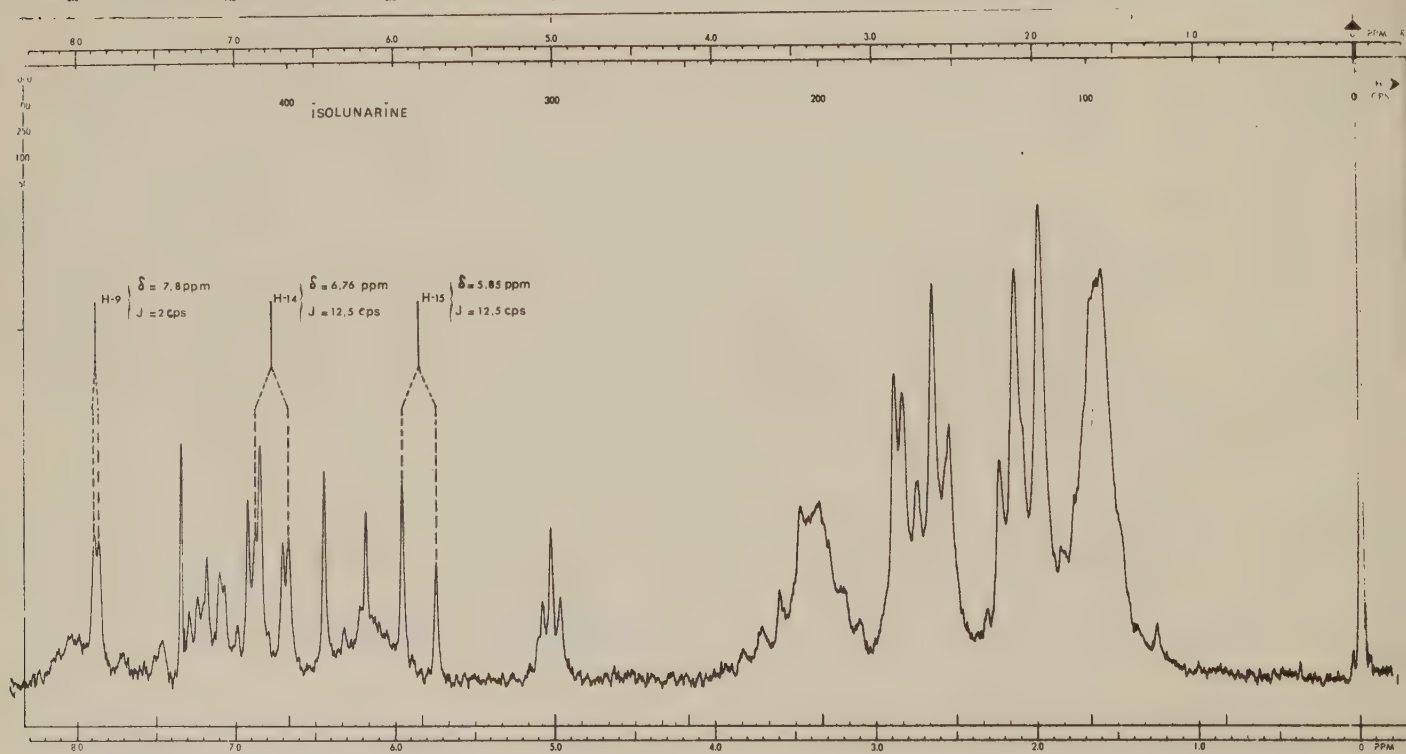
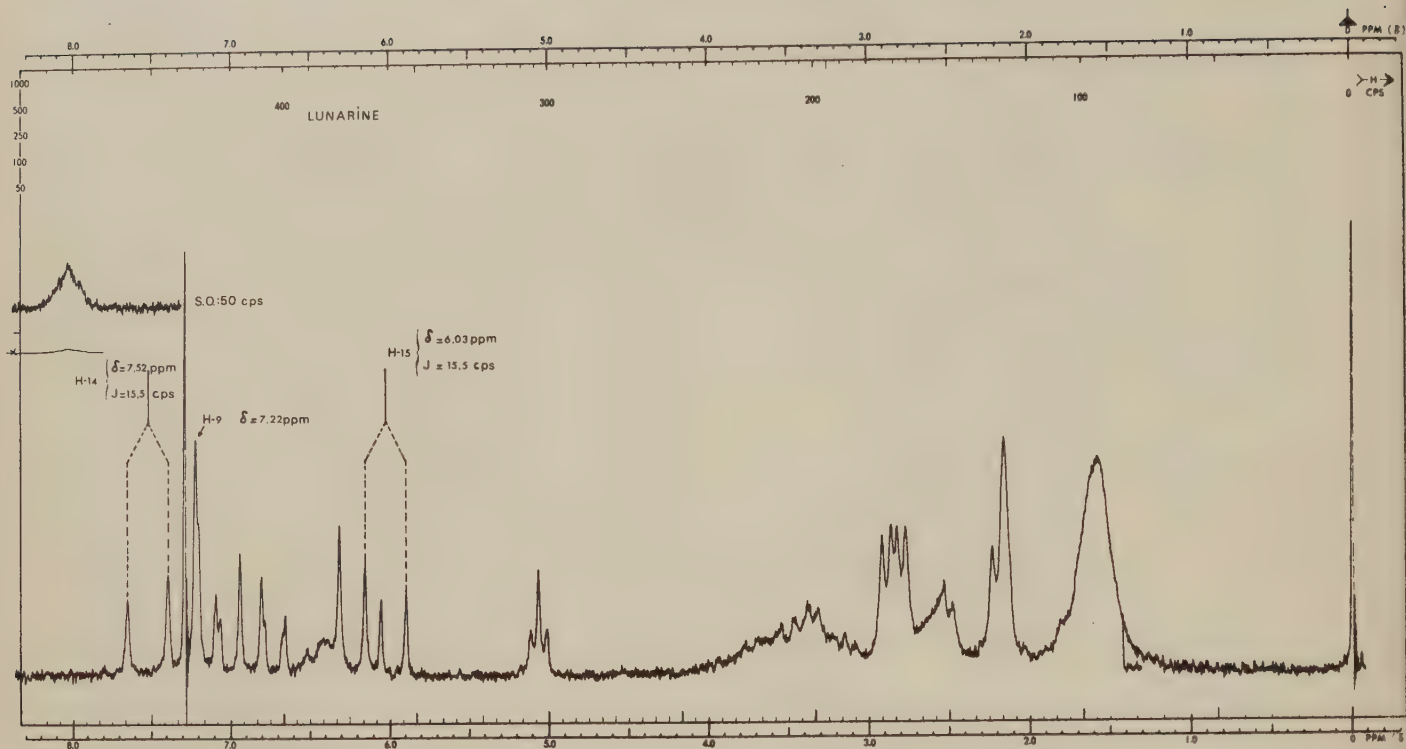
Les chromatographies répétées sur plaques préparatives de gel de silice ont permis d'isoler des produits très purifiés sur lesquels les déterminations spectrales habituelles ont été réalisées.

Les résultats sont regroupés dans les trois tableaux suivants, comparés aux résultats fournis par les produits d'origine (tableaux II, III et IV).

	Lunarine	Produit de transformation																																																								
IR (nujol)	bande NH 3290cm ⁻¹ cétone 1725cm ⁻¹ amides 1660 et 1540cm ⁻¹ insaturation 1615 et 970cm ⁻¹	3260 - 3280cm ⁻¹ 1720cm ⁻¹ 1660 et 1540cm ⁻¹ 1620-1630 et 980cm ⁻¹																																																								
UV (éthanol)	<table><tr><td></td><td><u>max en mμ</u></td><td><u>log ε</u></td></tr><tr><td rowspan="3">milieu {</td><td>226</td><td>4,41</td></tr><tr><td>296</td><td>4,35</td></tr><tr><td>317</td><td>4,25</td></tr><tr><td rowspan="3">neutre {</td><td>225</td><td>4,5</td></tr><tr><td>300</td><td>4,5</td></tr><tr><td>317</td><td>4,34</td></tr><tr><td rowspan="3">acide {</td><td>312</td><td>4,04</td></tr><tr><td>368</td><td>4,5</td></tr></table>		<u>max en mμ</u>	<u>log ε</u>	milieu {	226	4,41	296	4,35	317	4,25	neutre {	225	4,5	300	4,5	317	4,34	acide {	312	4,04	368	4,5	<table><tr><td></td><td><u>max en mμ</u></td><td><u>log ε</u></td></tr><tr><td rowspan="3">{</td><td>226</td><td>4,22</td></tr><tr><td>297</td><td>4,05</td></tr><tr><td>315</td><td>3,96</td></tr><tr><td rowspan="3">{</td><td>229</td><td>4,14</td></tr><tr><td>298</td><td>4,03</td></tr><tr><td rowspan="3">{</td><td>313</td><td>3,92</td></tr><tr><td>365</td><td>3,90</td></tr></table>		<u>max en mμ</u>	<u>log ε</u>	{	226	4,22	297	4,05	315	3,96	{	229	4,14	298	4,03	{	313	3,92	365	3,90														
	<u>max en mμ</u>	<u>log ε</u>																																																								
milieu {	226	4,41																																																								
	296	4,35																																																								
	317	4,25																																																								
neutre {	225	4,5																																																								
	300	4,5																																																								
	317	4,34																																																								
acide {	312	4,04																																																								
	368	4,5																																																								
		<u>max en mμ</u>	<u>log ε</u>																																																							
{	226	4,22																																																								
	297	4,05																																																								
	315	3,96																																																								
{	229	4,14																																																								
	298	4,03																																																								
	{	313	3,92																																																							
365		3,90																																																								
Masse		<u>M⁺ = 437</u>	<u>M⁺ = 437</u>																																																							
RMN (CDCl ₃)	Planche 3 <table><tr><td>H en 2</td><td><u>m</u></td><td>5,06ppm</td><td rowspan="2"> </td><td><u>m</u></td><td>5,03ppm</td><td rowspan="2">J=2cps</td></tr><tr><td>H en 9</td><td><u>s</u></td><td>7,22ppm</td><td><u>d</u></td><td>7,8ppm</td></tr><tr><td colspan="7">(Δ=0,58ppm)</td></tr><tr><td>H en 11</td><td><u>d</u></td><td>7 ppm</td><td>J=9cps</td><td><u>dd</u></td><td>7,16ppm</td><td rowspan="3">{ J_{H9-H11}=2cps J_{H11-H12}=8cps J=8cps</td></tr><tr><td>H en 12</td><td><u>d</u></td><td>6,73ppm</td><td>J=9cps</td><td><u>d</u></td><td>6,76ppm</td></tr><tr><td>H en 14</td><td><u>d</u></td><td>7,52ppm</td><td rowspan="2">{ J=15,5cps Δ=1,49ppm</td><td><u>d</u></td><td>6,76ppm</td><td rowspan="2">{ J=12,5cps Δ=0,93ppm</td></tr><tr><td>H en 15</td><td><u>d</u></td><td>6,03ppm</td><td><u>d</u></td><td>5,85ppm</td></tr><tr><td>H en 28</td><td><u>d</u></td><td>6,21ppm</td><td rowspan="2">{ J=15,5cps</td><td><u>d</u></td><td>6,31ppm</td><td rowspan="2">{ J=15,5cps</td></tr><tr><td>H en 29</td><td><u>d</u></td><td>6,93ppm</td><td><u>d</u></td><td>7,05ppm</td></tr></table>		H en 2	<u>m</u>	5,06ppm		<u>m</u>	5,03ppm	J=2cps	H en 9	<u>s</u>	7,22ppm	<u>d</u>	7,8ppm	(Δ=0,58ppm)							H en 11	<u>d</u>	7 ppm	J=9cps	<u>dd</u>	7,16ppm	{ J _{H9-H11} =2cps J _{H11-H12} =8cps J=8cps	H en 12	<u>d</u>	6,73ppm	J=9cps	<u>d</u>	6,76ppm	H en 14	<u>d</u>	7,52ppm	{ J=15,5cps Δ=1,49ppm	<u>d</u>	6,76ppm	{ J=12,5cps Δ=0,93ppm	H en 15	<u>d</u>	6,03ppm	<u>d</u>	5,85ppm	H en 28	<u>d</u>	6,21ppm	{ J=15,5cps	<u>d</u>	6,31ppm	{ J=15,5cps	H en 29	<u>d</u>	6,93ppm	<u>d</u>	7,05ppm
H en 2	<u>m</u>	5,06ppm		<u>m</u>	5,03ppm		J=2cps																																																			
H en 9	<u>s</u>	7,22ppm		<u>d</u>	7,8ppm																																																					
(Δ=0,58ppm)																																																										
H en 11	<u>d</u>	7 ppm	J=9cps	<u>dd</u>	7,16ppm	{ J _{H9-H11} =2cps J _{H11-H12} =8cps J=8cps																																																				
H en 12	<u>d</u>	6,73ppm	J=9cps	<u>d</u>	6,76ppm																																																					
H en 14	<u>d</u>	7,52ppm	{ J=15,5cps Δ=1,49ppm	<u>d</u>	6,76ppm		{ J=12,5cps Δ=0,93ppm																																																			
H en 15	<u>d</u>	6,03ppm		<u>d</u>	5,85ppm																																																					
H en 28	<u>d</u>	6,21ppm	{ J=15,5cps	<u>d</u>	6,31ppm	{ J=15,5cps																																																				
H en 29	<u>d</u>	6,93ppm		<u>d</u>	7,05ppm																																																					
<u>s</u> = singulet ; <u>d</u> = doublet ; <u>dd</u> = doublet dédoublé ; <u>m</u> = multiplet																																																										

TABLEAU II

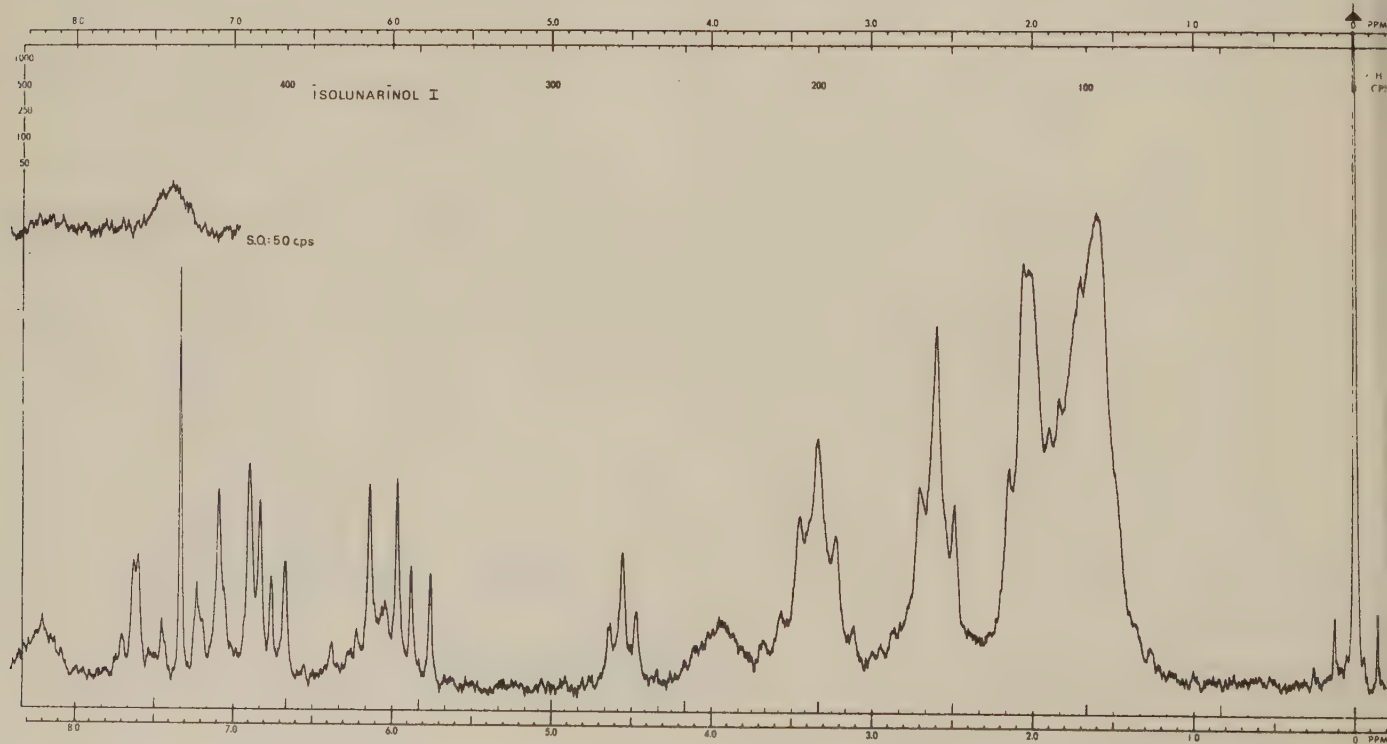
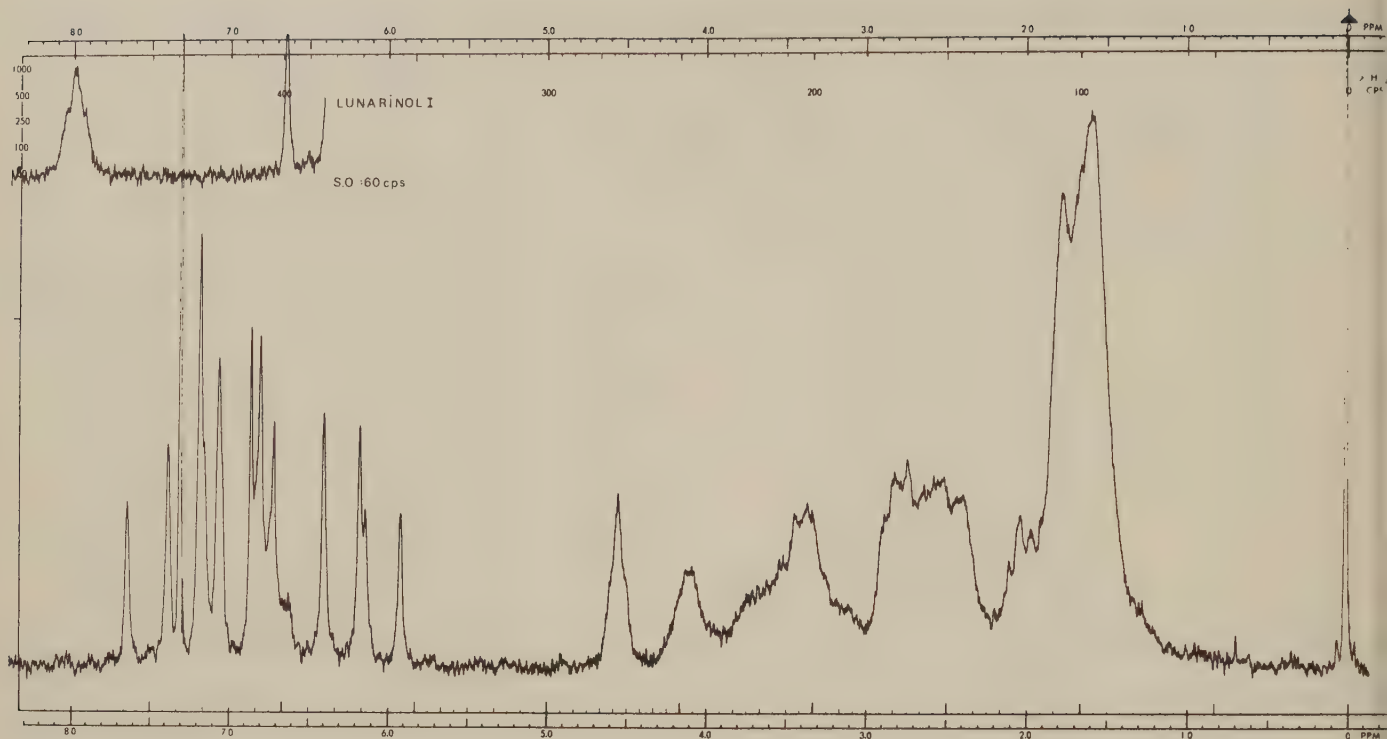
Planche 3



	Lunarinol I		Produit de transformation			
IR (nujol)	bande OH NH amides insaturation	3440cm ⁻¹ 3290cm ⁻¹ { 1660 et 1540-1560cm ⁻¹ { 1600-1620cm ⁻¹ 970cm ⁻¹	épaulement à 3275 - 3295cm ⁻¹ { 1665 et 1540 - 1560cm ⁻¹ { 1610 - 1630cm ⁻¹ 980cm ⁻¹	3380cm ⁻¹		
UV (éthanol)	max en mμ	log ε	max en mμ	log ε		
milieu neutre	{ 220 298 319	4,34 4,26 4,23	{ 216 297 315	4,39 4,08 4,04		
	{ 220 230 300 320	4,54 4,56 4,51 4,49	{ 217 229 297 312	4,37 4,31 4,11 4,08		
{ 297 317		4,3 4,27		{ 292 312	4,08 4,03	
Masse	M ⁺ = 439		M ⁺ = 439			
RMN (CDCl ₃)	Planche 4					
H en 2 H en 9 H en 11 H en 12 H en 14 H en 15 H en 28 H en 29	<u>m</u> <u>s</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u>	4,52ppm 7,15ppm 7,19ppm 6,75ppm 7,49ppm 6 ppm 6,21ppm 6,9 ppm	J=8,5cps (Δ=0,45ppm) J=8,5cps J=15,5cps Δ=1,49ppm J=16cps	<u>m</u> <u>d</u> <u>dd</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u>	4,54ppm 7,6 ppm 7,13ppm 6,97ppm 6,76ppm 5,85ppm 6 ppm 6,94ppm	J=2cps J _{H9-H11} =2cps J _{H11-H12} =8cps J=8cps J=13cps Δ=0,91ppm J=15,5cps
<u>m</u> = multiplet ; <u>s</u> = singulet ; <u>d</u> = doublet ; <u>dd</u> = doublet dédoublé						

TABLEAU III

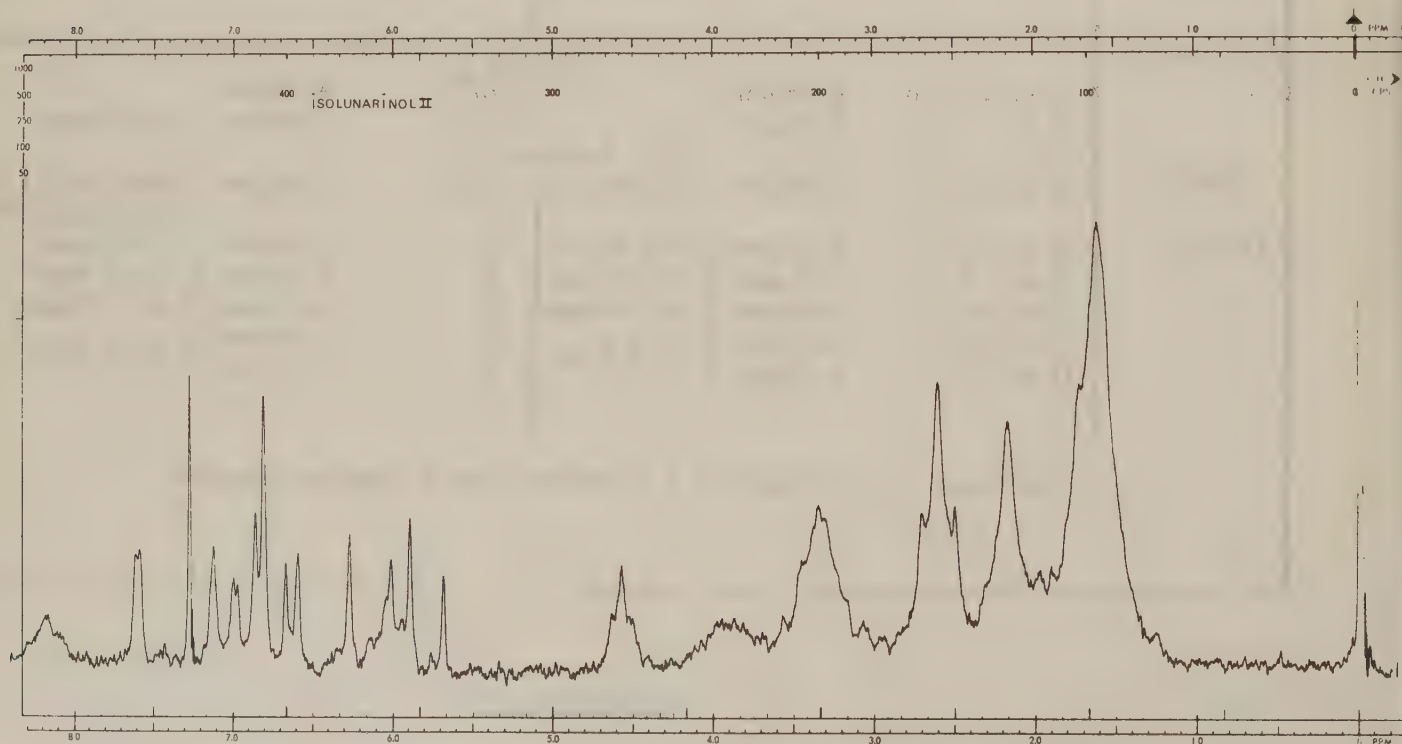
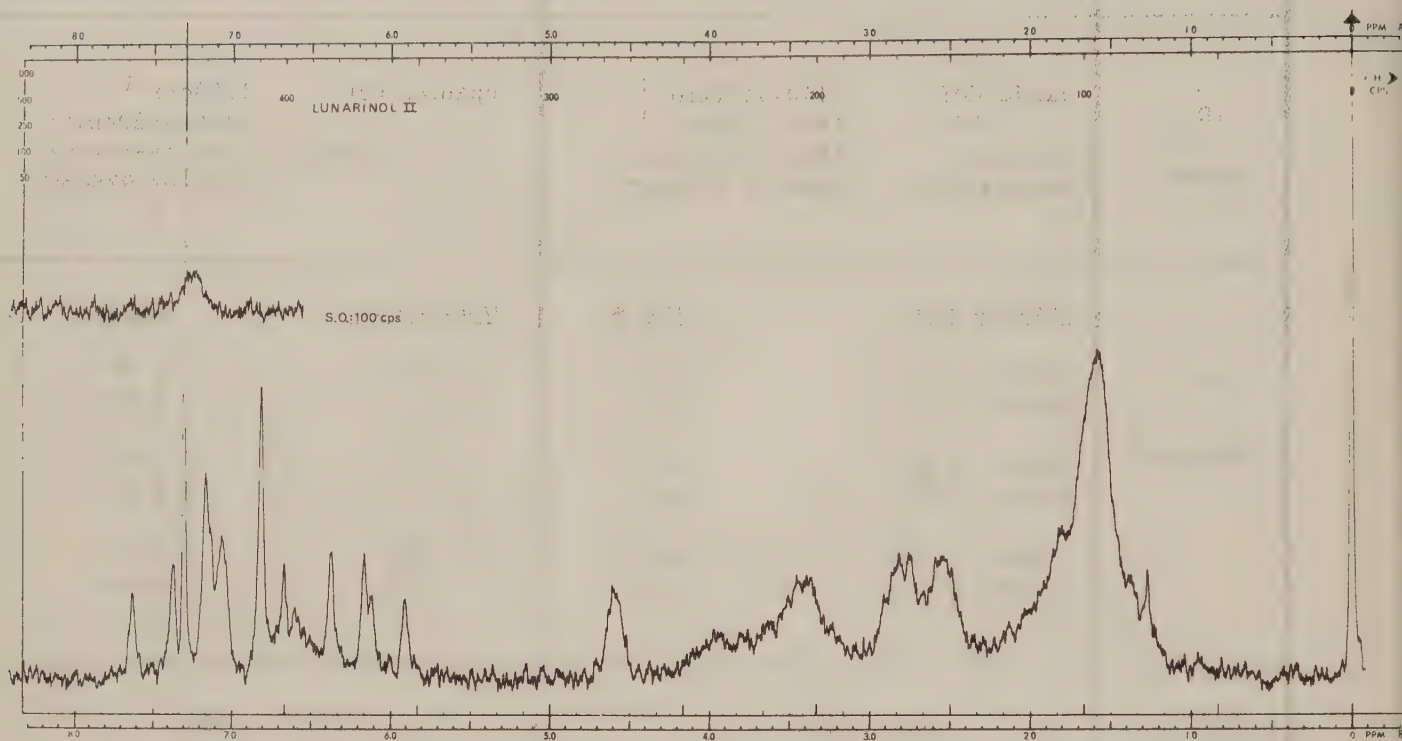
Planche 4



	Lunarinol II		Produit de transformation	
IR (nujol)	bande OH NH amides insaturation	3430-3440cm ⁻¹ 3270-3290cm ⁻¹ 1660 et 1550cm ⁻¹ 1640 et 970cm ⁻¹	épaulement 1660 et 1540-1550cm ⁻¹ 1620 et 975cm ⁻¹	3380cm ⁻¹ 3260-3280cm ⁻¹
UV (éthanol)	<u>max en mμ</u> milieu { neutre { milieu { acide { milieu { alcalin {	<u>log ε</u> 296 316 298 316 295 316	<u>max en mμ</u> { { { { { {	<u>log ε</u> 296 311 297 313 295 312
masse	M ⁺ = 439		M ⁺ = 439	
RMN (CDCl ₃)	H en 2 H en 9 H en 11 H en 12 H en 14 H en 15 H en 28 H en 29 <u>m</u> <u>s</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> 4,58ppm 7,16ppm 7,09ppm 6,72ppm 7,5 ppm 6,03ppm 6,24ppm 6,93ppm J=7,5cps J=7,5cps J=15,5cps Δ=1,47ppm J=15,5cps <u>m</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> <u>d</u> 4,57ppm 7,6ppm 7,05ppm 6,74ppm 6,71ppm 5,8 ppm 6,15ppm 7 ppm J=1,5cps JH9-H11=1,5cps JH11-H12=8,5cps J=8,5cps J=12,5cps Δ=0,91ppm J=15,5cps			
<u>m</u> = multiplet ; <u>s</u> = singulet ; <u>d</u> = doublet ; <u>dd</u> = doublet dédoublé				

TABLEAU IV

Planche 5



Ces résultats comparés appellent quelques remarques :

- en UV, les maximums sont peu différents quant à leur position, mais l'intensité de l'absorption est nettement moindre dans le cas des produits de transformation.
- en RMN (planches 3, 4 et 5), le signal du proton benzénique en C-9 se dédouble et se déplace nettement vers les champs faibles : glissement de 0,44 à 0,58ppm ; sa constante de couplage, de l'ordre de 2cps, est caractéristique d'un couplage entre protons benzéniques en position méta.

Le dédoublement du doublet attribué au proton en C-11 confirme cette interprétation.

D'autre part, alors que les signaux attribués aux protons éthyléniques en C-28 et C-29 apparaissent peu différents dans les deux séries de produits, les signaux correspondant à la résonance des protons éthyléniques en C-14 et C-15 subissent une nette modification.

Ils sont sensiblement déplacés vers les champs forts, surtout celui en C-14 (le glissement est de 0,73 à 0,79ppm pour H en C-24, de 0,15 à 0,23ppm pour H en C-15), leurs constantes de couplage sont fortement diminuées (15,5cps pour la lunarine et les lunarinols, 12,5 à 13cps pour leurs produits de transformation), enfin la différence des déplacements chimiques des deux protons est également nettement diminuée (1,47 à 1,49ppm pour la lunarine et les lunarinols, 0,91 à 0,93ppm pour les produits formés).

Compte-tenu de la structure de la lunarine et de ses dérivés et des observations précédentes, il apparaît que la transformation de ces produits en solution est liée à la présence du système cinnamique.

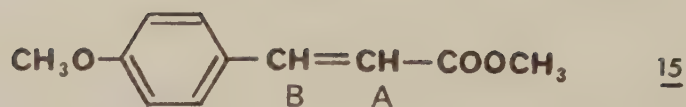
Or, depuis longtemps, on connaît la possibilité d'une isomérie trans $\leftrightarrow$ cis des composés cinnamiques sous l'effet de la lumière (37,38).

On sait, d'autre part, que les acides alcoyl-trans cinnamiques sont les formes stables et qu'ils absorbent, dans l'UV, à une plus grande longueur d'onde et avec une intensité supérieure à celle que l'on observe pour leurs homologues cis-cinnamiques, plus labiles, produits par irradiation des premiers (39).

Ainsi, par exemple, l'acide trans-cinnamique absorbe à 272m μ (ϵ = 20.000), tandis que son isomère cis absorbe à 259m μ (ϵ = 10.800) (40).

Il est, par ailleurs, connu que les constantes de couplage entre protons éthyléniques trans sont plus grandes que celles observées pour leurs homologues cis (41). Ces dernières sont, cependant, anormalement élevées dans le cas des dérivés cinnamiques. De telles constantes ne se rencontrent, parmi les oléfines, que pour les dérivés du styrène et du triméthyl-2,4,6 styrène : ce caractère peut donc être attribué à la conjugaison de la liaison éthylénique avec un noyau aromatique (42). Cette conjugaison explique, en outre, que le proton le plus blindé, migrant au champ le plus fort, soit le proton le plus éloigné du noyau aromatique.

A titre d'exemple, la position des protons éthyléniques dans les p-méthoxy-cinnamates de méthyle, 15, est donnée dans le tableau V (43).



	$\delta \text{ H}_\text{A}$	$\delta \text{ H}_\text{B}$	$\delta_\text{B} - \delta_\text{A}$	J_AB
Isomère <u>trans</u>	6,30ppm	7,66ppm	1,36ppm	16cps
Isomère <u>cis</u>	5,75ppm	6,76ppm	1,01ppm	13cps

TABLEAU V

Ces différentes données permettent donc d'attribuer la transformation de la lunarine et des lunarinols à une isomérisation trans → cis de la double liaison entre les C-14 et 15, donnant ainsi naissance à une isolunarine et à des isolunarinols I et II.

Cette explication a été confirmée :

- par l'absence de transformation à l'abri de la lumière ;
- par l'absence de transformation du tétrahydrolunarinol I ;
- par l'obtention des mêmes produits d'hydrogénation catalytique à partir du lunarinol I et de l'isolunarinol I, de la lunarine et de l'isolunarine.

Il convient de noter que la réversibilité connue de l'isomérisation cinnamique (40) n'a pas été observée pour cette série de composés, dans les conditions utilisées.

L'inconvénient présenté par cette rapide isomérisation spontanée de la lunarine et des lunarinols a conduit à préparer leurs dérivés hydrogénés, plus maniables.

C- HYDROGENATION CATALYTIQUE DE LA LUNARINE ET DES LUNARINOLS

1°) - Hydrogénation catalytique de la lunarine -

Réalisée afin d'obtenir la seule saturation des liaisons éthyléniques, elle a été opérée dans des conditions plus douces que celles utilisées précédemment par P. POTIER et J. LE MEN (14, 17).

La lunarine, solubilisée dans l'éthanol, est hydrogénée en présence de charbon palladié, à pression et température ordinaires. Après vingt quatre heures, on note la présence de deux produits principaux :

- le moins polaire correspond à la saturation des deux doubles liaisons ($M^+ = 441$) : c'est donc la tétrahydrolunarine,

- l'autre a une masse moléculaire supérieure de six unités à celle de la lunarine ($M^+ = 443$) : c'est l'hexahydrolunarine.

• La tétrahydrolunarine, 16

Elle répond à la formule brute $C_{25}H_{35}O_4N_3$ ($M^+ = 441$).

Sur son spectre IR, on note la disparition des bandes d'insaturation éthylénique tandis que subsistent les bandes NH, cétonique et amides.

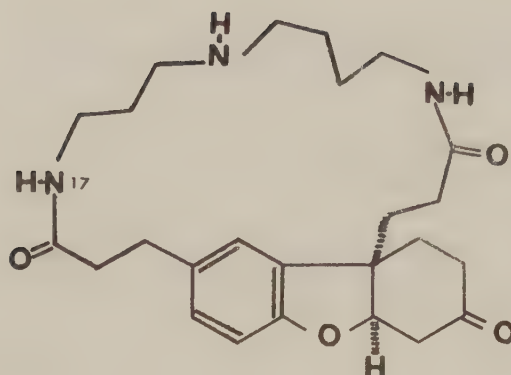
Elle présente une courbe de dichroïsme circulaire avec 3 maximums positifs à 233, 283 et 307m μ .

Son spectre UV montre trois maximums en milieu neutre à 229, 287 et 291m μ sans modification en milieu acide ni en milieu alcalin.

Son spectre de RMN (planche 6) est sensiblement simplifié entre 6 et 8ppm : seuls les protons benzéniques en C-9, C-11 et C-12 subsistent. Les protons amidiques sont déplacés et se trouvent, très voisins, entre 6,8 et 7,5ppm.

La résonance du proton amidique 17 à un champ plus fort que le même proton dans la lunarine peut être attribuée à la disparition de la conjugaison Ψ -CH=CH-.

La tétrahydrolunarine répond ainsi à la structure :

16

• L'hexahydrolunarine, 17

Elle correspond à la formule brute $C_{25}H_{37}O_4N_3$ ($M^+ = 443$).

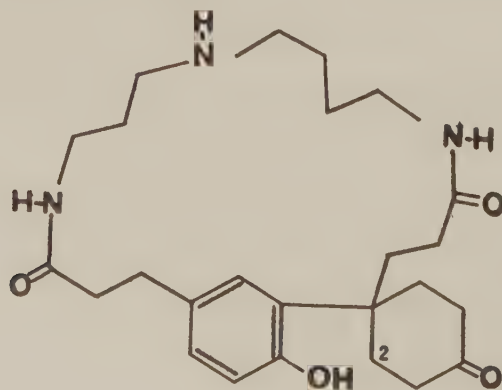
Elle est dépourvue d'activité optique, ce qui traduit l'apparition d'un plan de symétrie.

Son spectre IR présente les bandes caractéristiques des NH, de la cétone et des amides : les bandes d'insaturation éthylénique ont disparu.

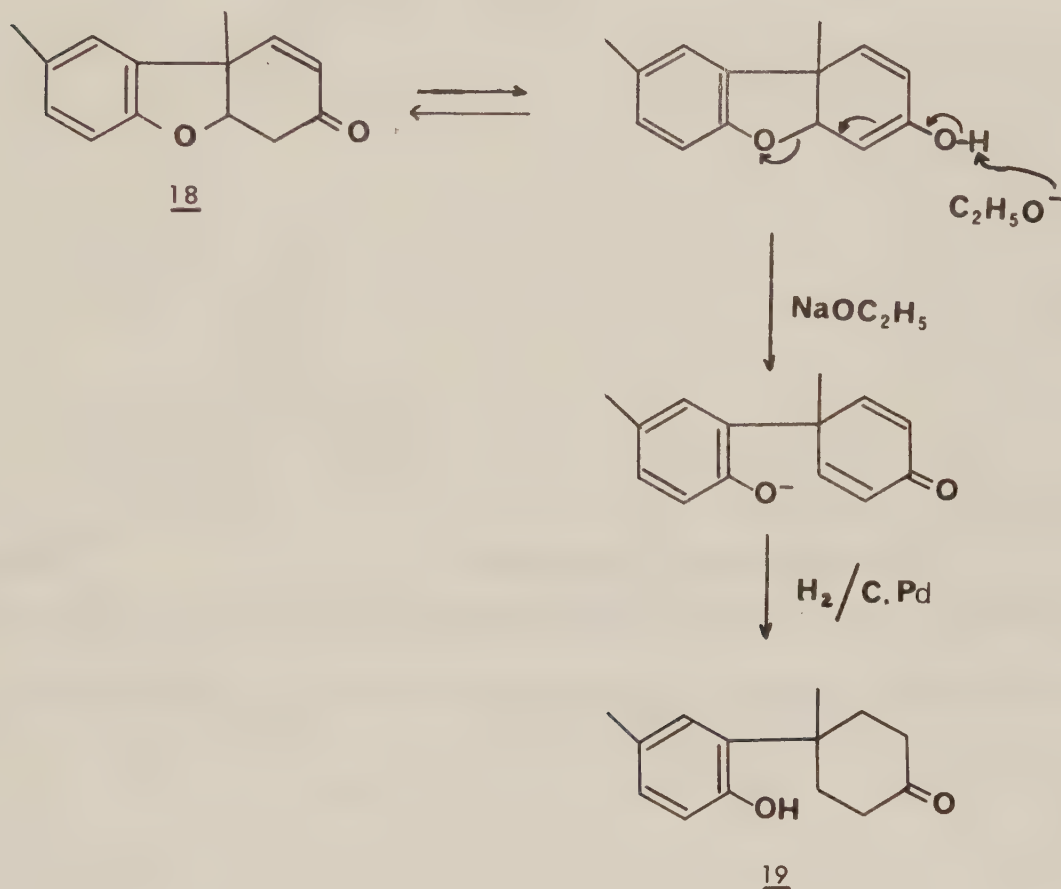
Le spectre UV présente deux maximums à 229 et 285m μ , inchangés en milieu acide mais subissant un déplacement bathochrome en milieu alcalin : ces deux maximums apparaissent alors à 251 et 305m μ .

La caractéristique essentielle de son spectre de RMN (planche 6) est la disparition du signal attribué au proton angulaire en 2.

Ces résultats ont conduit à attribuer à l'hexahydrolunarine une structure ouverte, de la forme :

17

La partie hexahydrodibenzofuranne de la lunarine peut être rapprochée des composés du type de la cétone de Pummerer (44). Or, on sait que la cétone de Pummerer, 18, en milieu alcalin, subit une ouverture selon un mécanisme inverse de celui admis pour sa formation (rétro-Michael), qui conduit, après hydrogénation, au produit phénolique, 19.



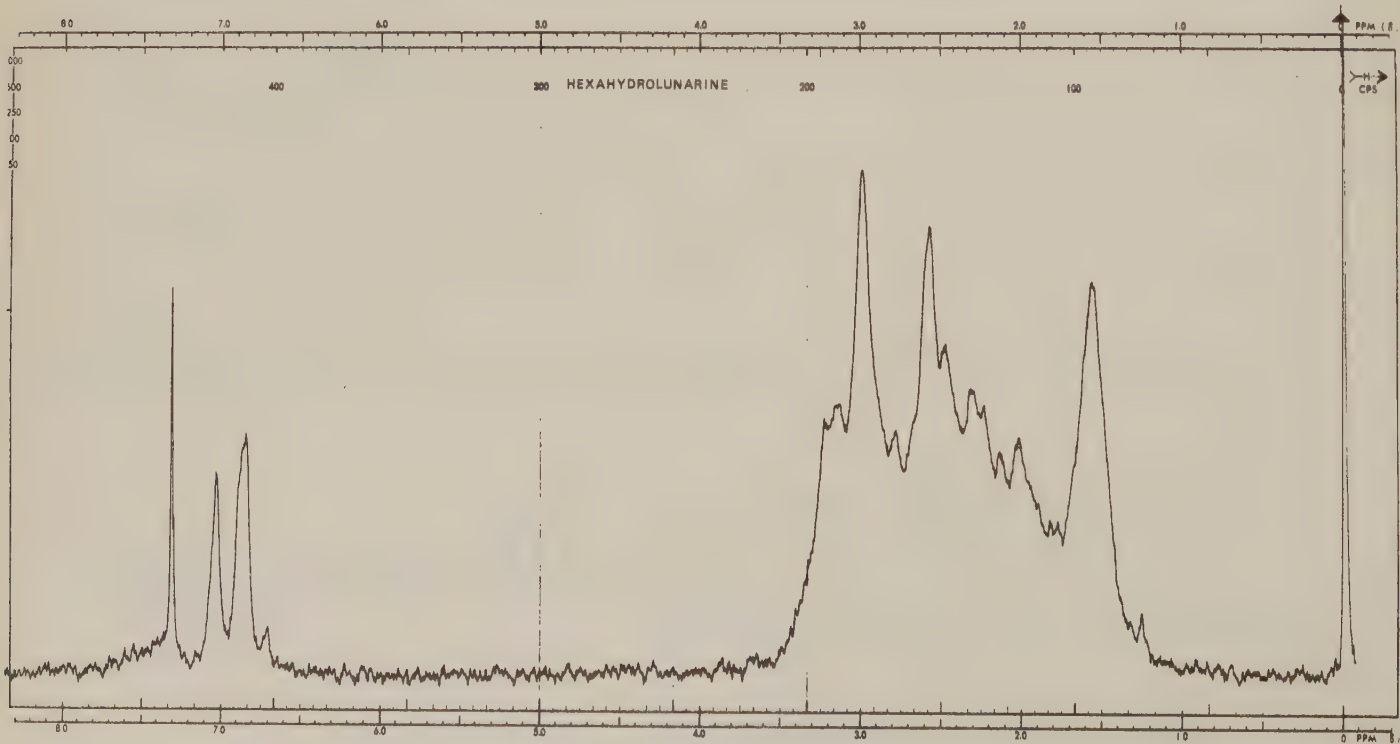
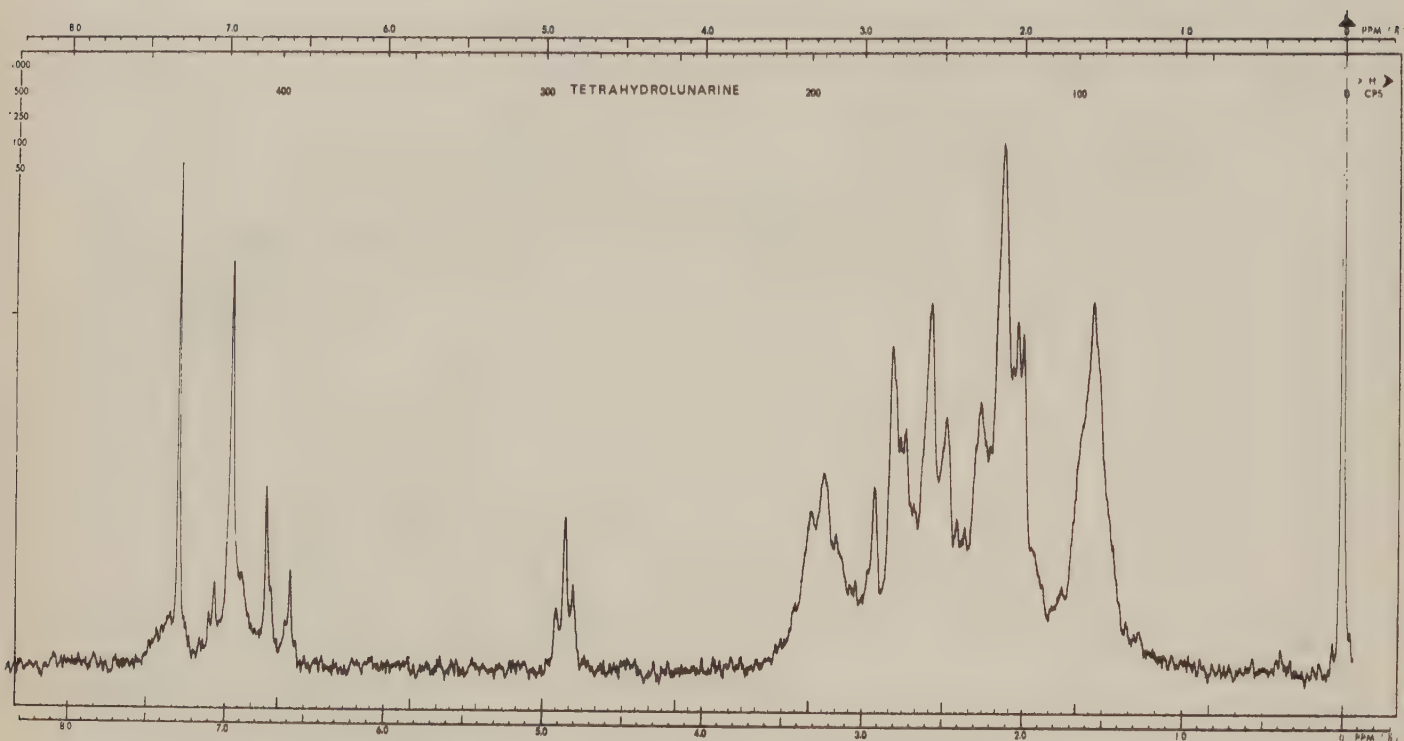
Soumettant la lunarine aux mêmes conditions, nous avons obtenu quantitativement le produit d'ouverture, en tous points identique à l'hexahydrolunarine décrite ci-dessus.

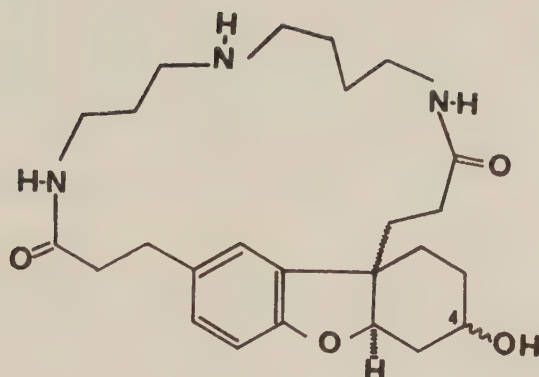
2°) - Hydrogénation catalytique des lunarinols -

Réalisée dans les mêmes conditions que l'hydrogénation de la lunarine, elle conduit, dans les deux cas, à un produit largement majoritaire qui correspond à la saturation des deux liaisons éthyléniques.

On obtient ainsi les tétrahydrolunarinols I et II, 20a et 20b.

Planche 6





20

$$\begin{cases} a = \text{OH}-4\beta = \underline{5} \\ b = \text{OH}-4\alpha = \underline{6} \end{cases}$$

● Le tétrahydrolunarinol I, 20a (= 5)

Cristallisé du mélange éthanol/acétone, il correspond à la formule brute $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_3$ ($M^+ = 443$) ; $[\alpha]_D^{20} = +106^\circ$ (éthanol).

Il possède un pouvoir rotatoire dextrogyre et présente, sur son spectre IR, les bandes caractéristiques des OH, NH et amides.

Sur son spectre UV, deux maximums apparaissent à 231 et 286m μ qui ne subissent de changement sensible, ni en milieu acide ni en milieu alcalin.

Sa courbe de dichroïsme circulaire présente deux maximums positifs à 229 et 282m μ .

Quant à son spectre de RMN, il se montre proche de celui de la tétrahydrolunarine avec le même rapprochement des protons portés par les N amidiques.

Le proton porté par le même C (C-4) que l'OH alcoolique apparaît sous forme d'un multiplet centré sur 3,85ppm.

● Le tétrahydrolunarinol II, 20b (= 6)

Correspond également à la formule brute $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_3$ ($M^+ = 443$).

Il possède aussi un pouvoir rotatoire dextrogyre $[\alpha]_D^{20} = +71^\circ$ (éthanol).

Ses spectres IR et UV sont proches de ceux du tétrahydrolunarinol I. Sur son spectre de RMN, on note, pour le proton en C-4, la présence d'un multiplet centré sur 3,95ppm.

A côté de ces produits majoritaires d'hydrogénation de la lunarine et des lunarinols, correspondant à la fixation de deux molécules d'hydrogène pour la tétrahydrolunarine et les tétrahydrolunarinols I et II et de trois molécules d'hydrogène pour l'hexahydrolunarine, on observe la formation, dans les proportions de 3 à 4% pour la lunarine, de 8 à 15% pour les lunarinols, de produits dont la structure n'a pas été précisée. Les mêmes produits se retrouvent lorsqu'on hydrogène les isolunarine et isolunarinols.

Ces produits possèdent une masse supérieure de 32 unités à la masse de leurs produits d'origine.

Leurs spectres IR et de RMN montrent la disparition de l'insaturation éthylénique : il s'agit donc de 28 unités de masse supplémentaires par rapport aux tétrahydrolunarine et tétrahydrolunarinols.

L'hydrogénation, répétée en milieu méthanolique, fournit des produits ayant une masse supérieure de 14 unités à celle des produits hydrogénés normaux.

Il semble donc que la formation de ces produits soit liée au solvant : la présence d'un triplet à 1,35ppm dans le spectre de RMN de la (M + 32) lunarine, par exemple, paraît confirmer la fixation d'un radical $\text{CH}_3\text{-CH}_2\cdot$.

La localisation de ce radical éthyle n'a pu être précisée.

D - ACÉTYLATION DE LA LUNARINE ET DES LUNARINOLS

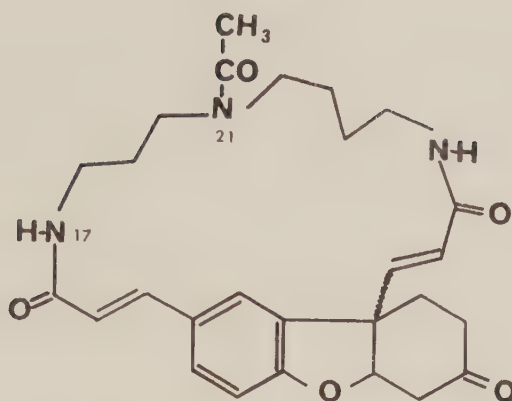
L'acétylation de la lunarine et des lunarinols a été entreprise pour deux raisons :

- en ce qui concerne la lunarine, confirmer l'existence de liaison hydrogène entre le doublet de l'azote 21 et le proton porté par l'azote 17, qui explique, sur le spectre de RMN, le net déplacement du proton amidique vers les champs faibles.
- pour les lunarinols, préparer des dérivés permettant d'appliquer la méthode de A. HOREAU (33, 34, 35) afin de déterminer la configuration de l'OH dans les lunarinols I et II.

1°) - Acétylation de la lunarine -

L'acétylation de la lunarine, déjà réalisée par P. POTIER (17) a été reprise par action de l'anhydride acétique dans la pyridine à température ordinaire pendant 24 heures.

La N-acétyllunarine, 21, est le seul produit obtenu :

21

Douée d'un pouvoir rotatoire dextrogyre $[\alpha]_D = + 219^\circ$ (éthanol).

Son spectre IR présente les bandes caractéristiques des NH ($3270-3290\text{cm}^{-1}$) cétone ($1725-1730\text{cm}^{-1}$), amides (1665 et $1545-1555\text{cm}^{-1}$), insaturation éthylénique ($1620-1635$ et 980cm^{-1}).

Son spectre de RMN est très voisin de celui de la lunarine ; seules différences nettes :

- l'apparition d'un singulet correspondant aux trois protons du groupement acétyle à $2,03\text{ppm}$;

- le déplacement du signal du proton amidique en 17 : de $8,96\text{ppm}$ dans la lunarine à $7,65\text{ppm}$ dans la N-acétyllunarine.

Ce déplacement semble confirmer l'existence de la liaison hydrogène invoquée pour expliquer l'éloignement du signal du proton amidique en 17 dans le spectre de la lunarine. L'amidification de la fonction amine détruit cette liaison hydrogène, provoquant ainsi la résonance du proton en 17 à un champ plus fort.

2°) - Acétylation des lunarinols -

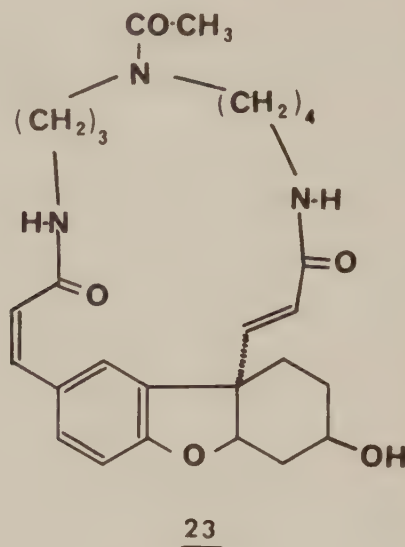
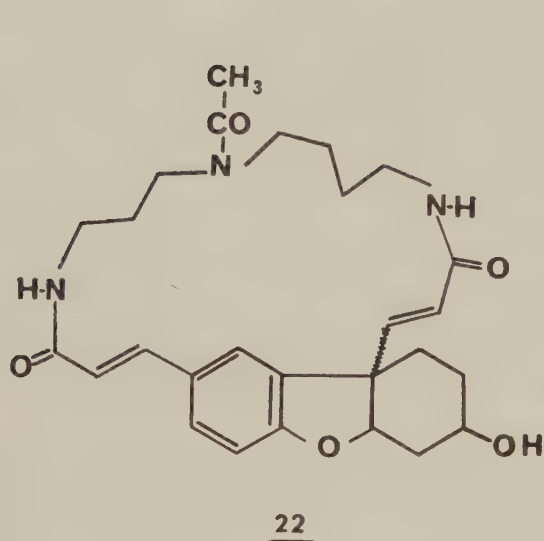
P. POTIER (¹⁷) avait obtenu le dérivé diacétylé du lunarinol I par action de l'anhydride acétique dans la pyridine, à chaud. L'acétylation du lunarinol I a été reprise dans le méthanol par action de l'anhydride acétique à température ordinaire ; elle conduit à deux produits majoritaires.

Sur les spectres IR, on observe les bandes caractéristiques des OH, NH, amides et doubles liaisons éthyléniques.

Tous deux ont une masse ($M^+ = 481$) correspondant à la fixation d'un seul groupement acétyle qui, à la vue des spectres IR est un groupement $>\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_3$.

L'étude des spectres de RMN, en particulier dans la zone comprise entre 5 et 8 ppm, permet de différencier les deux composés :

- le produit majoritaire est le N-acétyllunarinol I, 22
- le produit minoritaire est le N-acétylisolunarinol I, 23



L'isomérisie de double liaison se fait probablement, au moins en partie, au niveau du lunarinol I en cours d'acétylation ; elle continue à se faire au niveau du dérivé acétylé puisqu'il est fort difficile de séparer les deux dérivés.

Pour éviter l'inconvénient de cette isomérisie, les autres réactions d'acétylation ont été réalisées sur les lunarinols hydrogénés.

Nous avons ainsi préparé les dérivés N-acétylés des tétrahydrolunarinols I et II, 24a et b, et le dérivé O,N-diacétylé du tétrahydrolunarinol I, 25

Les dérivés monoacétylés sont obtenus par action de l'anhydride acétique en présence de méthanol à température ordinaire.

Le dérivé diacétylé est obtenu par action de l'anhydride acétique en présence de pyridine, également à température ordinaire.

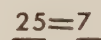
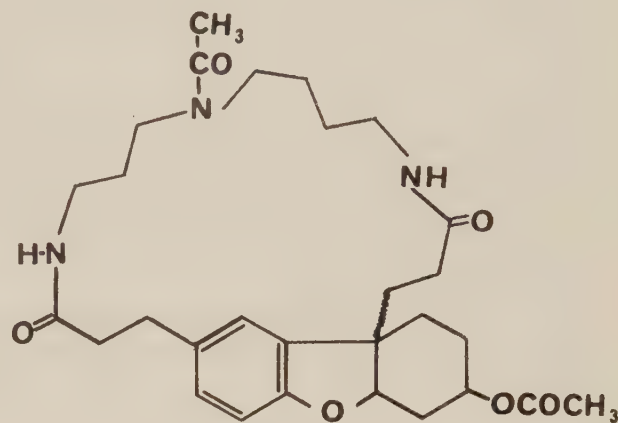
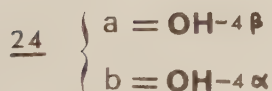
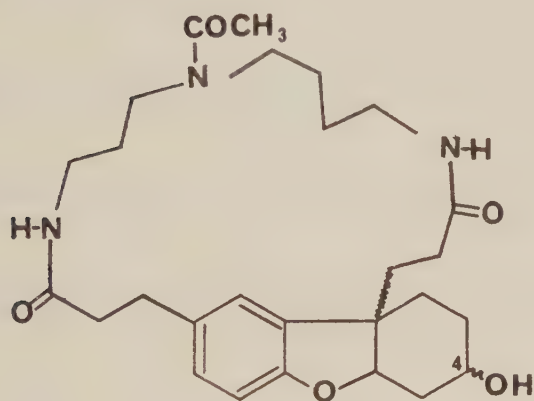
Les spectres IR de ces composés présentent les bandes caractéristiques des NH et des amides. Sur celui du dérivé diacétylé on note, en outre, la présence d'une bande ester à 1735cm^{-1} .

Leurs spectres UV sont très analogues entre eux et diffèrent peu de ceux des produits non acétylés homologues, avec deux maximums à 231 et $286\text{m}\mu$, sans modification sensible en milieu alcalin ou acide.

Quant à leurs spectres de RMN, ils sont caractéristiques des dérivés tétrahydrogénés : les signaux attribués aux protons benzéniques en 9, 11 et 12 et au proton angulaire en 2 se retrouvent pratiquement inchangés.

Il faut cependant remarquer :

- le déplacement vers les champs faibles du signal de résonance du proton en 4, en α du groupement alcool, lorsque celui-ci est estérifié (dans le O,N-diacétyltétrahydrolunarinol I) ;
- le déplacement vers les champs forts des protons amidiques dans les trois dérivés ;
- l'apparition du ou des singulets dus aux CH_3 - des groupements acétyles.



Comme cela a déjà été mentionné ci-dessus, l'application de la méthode de A. HOREAU (33,34,35) à ces dérivés acétylés des tétrahydrolunarins n'a pas permis de préciser la configuration de l'OH.

E - METHYLATION DE LA LUNARINE ET DES LUNARINOLS

Parallèlement à l'isolement et la caractérisation des alcaloïdes secondaires LBX, et LBZ, dont il sera question ci-dessous, des essais de méthylation de la lunarine et des lunarinols ont été entrepris.

Le premier essai a consisté à réaliser la réaction dite de PICTET-SPENGLER (45) sur la lunarine : l'emploi de formol en milieu acide à chaud sur l'alcaloïde a conduit à l'obtention d'un mélange très complexe à partir duquel aucun produit n'a pu être isolé.

L'emploi de l'aldéhyde formique en milieu acétique et en présence de borohydrure de sodium à température ordinaire a conduit à quatre produits dérivés des lunarinols.

Les mêmes conditions ont été reprises en partant du seul lunarinol I, après un essai peu satisfaisant de la méthode d'ESCHWEILER-CLARKE (acide formique/formol) (46,51). Deux produits sont obtenus : l'un a une masse supérieure de douze unités à celle du lunarinol I ($M^+ = 451$), l'autre, supérieure de quatorze unités à celle de la matière première ($M^+ = 453$).

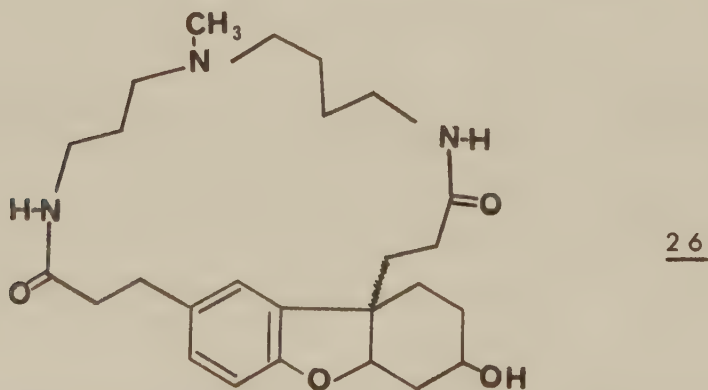
Difficiles à séparer et à utiliser en raison d'une isomérisation très rapide de la double liaison cinnamique, ces produits ont été hydrogénés catalytiquement et c'est sous leur forme saturée ($M^+ = 455$ et $M^+ = 457$) qu'ils ont été étudiés.

Ces mêmes produits hydrogénés sont obtenus par action du formol en milieu acétique et en présence de borohydrure de sodium sur le tétrahydrolunarinol I.

Lorsque la réaction est réalisée à la température ordinaire, le produit correspondant à $M^+ = 455$ est majoritaire ; celui qui correspond à $M^+ = 457$ le devient lorsqu'on opère à la température du bain de glace,

Le produit de masse 457 offre un spectre de RMN caractéristique des produits hydrogénés dans la zone comprise entre 3,5 et 8ppm.

L'apparition d'un singulet, correspondant à 3 protons, à 2,15ppm permet de penser qu'il s'agit bien du N-méthyltétrahydrolunarinol I, 26, produit attendu de la réaction :

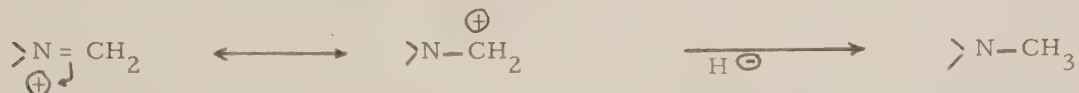


Par contre, le produit de masse 455 ne présente pas de groupement $>N-CH_3$ visible. La différence de deux unités par rapport au produit précédent permet d'envisager qu'il pourrait résulter de la cyclisation d'un méthylène-immonium intermédiaire.

Le mécanisme de méthylation par l'aldéhyde formique en milieu acide et en présence de borohydrure de sodium est connu pour être :

- dans un premier temps, protonation de $\text{CH}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_2\text{-OH}^+$ qui subit l'attaque du doublet de l'azote à métyler avec déshydratation et formation d'un ion immonium intermédiaire $\text{>N}=\text{CH}_2^+$;

- dans un deuxième temps, réduction de l'ion immonium par un ion hydrure conduisant au produit méthylé >N-CH_3 :

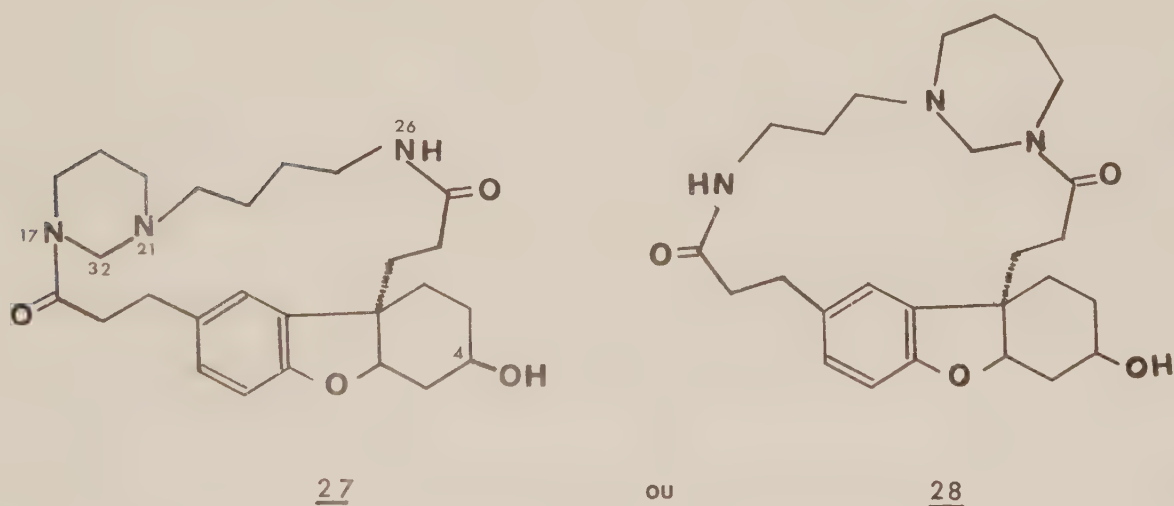


On peut penser que toute partie nucléophile de la molécule, convenablement située, entre en compétition avec les ions hydrures vis à vis de l'ion immonium.

Or, sur le spectre de RMN, on note :

- la disparition d'un proton amidique ;
- l'apparition d'un multiplet correspondant à 2 protons (entre 3,7 et 4,1 ppm) qui peut être attribué à un groupement $\text{-CH}_2\text{-}$ entre 2 N, du type $\text{>N-CH}_2\text{-N<}$

Le produit cyclisé pourrait donc avoir pour structure :



Cependant, la formation d'un cycle diazoté perhydropyrimidine paraît plus favorisée que celle d'un cycle heptagonal, par cyclisation entre l'amine et l'azote amidique en 26.

Le tétrahydrolunarinol I, soumis à la seule action de l'aldéhyde formique en milieu acide, fournit exclusivement ce produit cyclisé.

La possibilité d'une cyclisation entre l'azote basique 21 et l'OH en 4 a été écartée par l'obtention du dérivé O-acétylé ($M^+ = 497$), par action de l'anhydride acétique dans la pyridine.

L'isolement des alcaloïdes LBX et LBZ, dont il sera question ci-dessous, et la détermination de leur structure, nous ont conduits à préparer des produits cyclisés analogues, à partir de la lunarine et des lunarinols I et II.

Les composés obtenus à partir de la lunarine et du lunarinol II (produit mineur de la réduction de la lunarine par NaBH_4), se sont révélés en tous points comparables aux alcaloïdes extraits des graines de Lunaire dont il va être question maintenant.

CHAPITRE III

ISOLEMENT ET ÉTUDE STRUCTURALE
DE TROIS NOUVEAUX ALCALOÏDES

Le procédé d'extraction utilisé diffère peu de celui employé par P. POTIER (17). Il consiste en un dégraissage préalable, par de l'éther de pétrole, des graines pulvérisées, puis en un épuisement à froid de la poudre délipidée, par de l'alcool à 95° additionné d'acide acétique.

Le lixiviat ainsi obtenu est privé de son alcool par distillation sous vide avant d'être dégraissé de nouveau par de l'éther de pétrole.

Après alcalinisation de la solution d'acétates par de l'ammoniaque, les alcaloïdes sont extraits par CH_2Cl_2 . Ces alcaloïdes totaux sont chromatographiés sur colonne d'alumine (activité I) dans le CH_2Cl_2 .

L'élution par le CH_2Cl_2 pur permet d'isoler la lunarine ; le CH_2Cl_2 contenant 1 à 5% de méthanol élue la lunaridine ; enfin, le CH_2Cl_2 à 5-10% de méthanol sépare la numismine.

Lunarine et lunaridine sont recristallisées dans l'alcool à 96°, la numismine dans l'acétone.

A noter que la lunariamine précédemment décrite (11) * n'a pas été retrouvée.

Ces alcaloïdes majoritaires cristallisés, d'autres composés alcaloïdiques, en quantités beaucoup plus modestes, sont devenus perceptibles dans certaines fractions de la chromatographie précédente, grâce à la chromatographie sur couche mince.

* Les échantillons de lunariamine qui nous sont parvenus se sont révélés identiques à la forme jaune de la numismine dont il sera question plus loin.

Ils ont été séparés grâce à des chromatographies successives sur colonne d'alumine et plaques préparatives de silice. Alors que la lunarine représente 40% des alcaloïdes totaux, la lunaridine 23% et la numismine 4,5%, l'alcaloïde LBX représente seulement 0,04%, LBY 0,07% et LBZ 0,01% (tableau VI).

Alcaloïdes extraits de Lunaria biennis Moench par ordre de polarité croissante	Formule brute (spectre de masse)	$[\alpha]_D$ (éthanol)	F	Rdt à partir des alcaloïdes totaux
LBX	$C_{26}H_{31}O_4N_3$ ($M^+ = 449$)	+ 201°	250°C avec décomposition	0,04%
LBZ	$C_{26}H_{33}O_4N_3$ ($M^+ = 451$)	-	Produit amorphe	0,01%
Lunarine	$C_{25}H_{31}O_4N_3 \cdot H_2O$ ($M^+ = 437$)	+ 344°	238-240°C	40 %
LBY	$C_{25}H_{33}O_4N_3 \cdot 2H_2O$ ($M^+ = 439$)	+ 142°	268-273°C	0,07%
Numismine	$C_{25}H_{33}O_4N_3$ ($M^+ = 439$)	0	> 270°C avec décomposition	4,5 %
Lunaridine	$C_{25}H_{31}O_4N_3$ ($M^+ = 437$)	+ 267°	> 265°C avec décomposition	23 %

TABLEAU VI

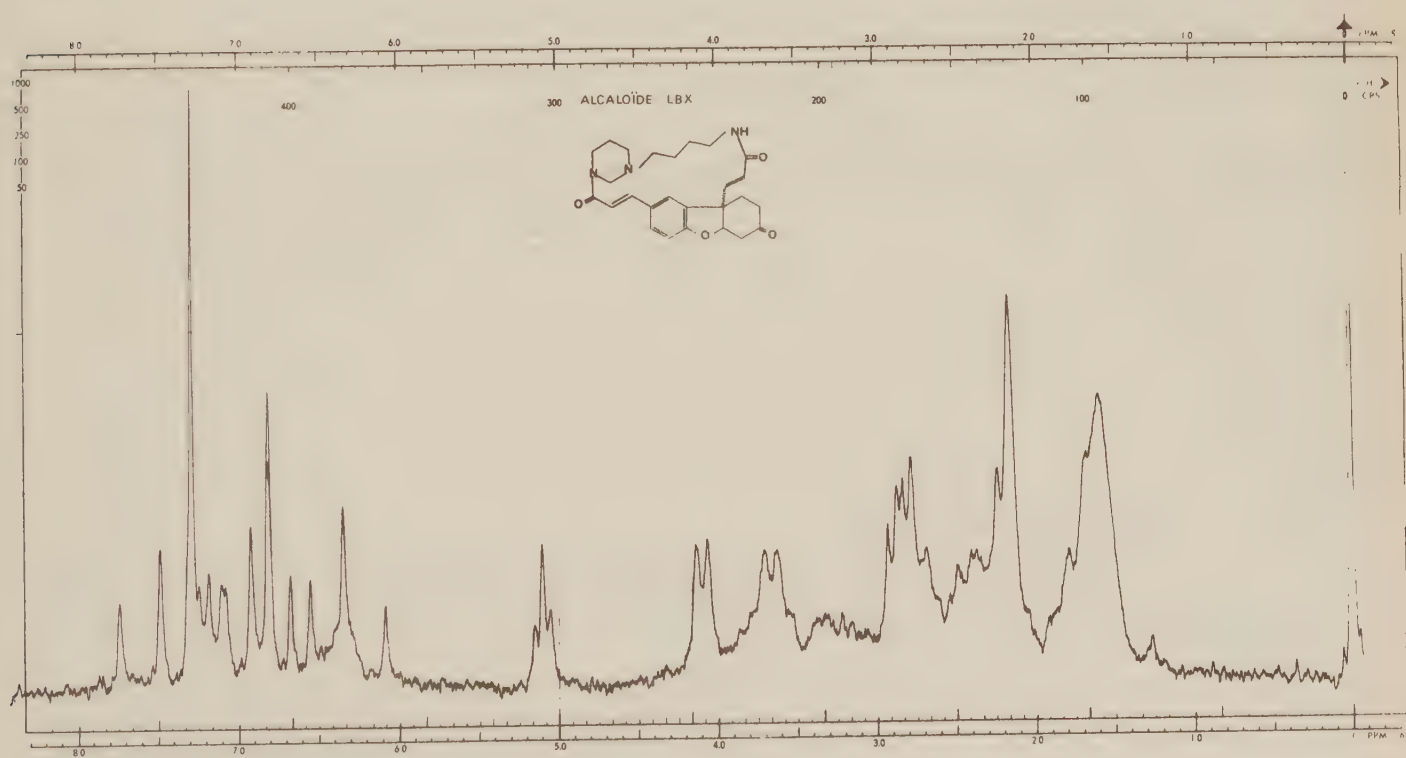
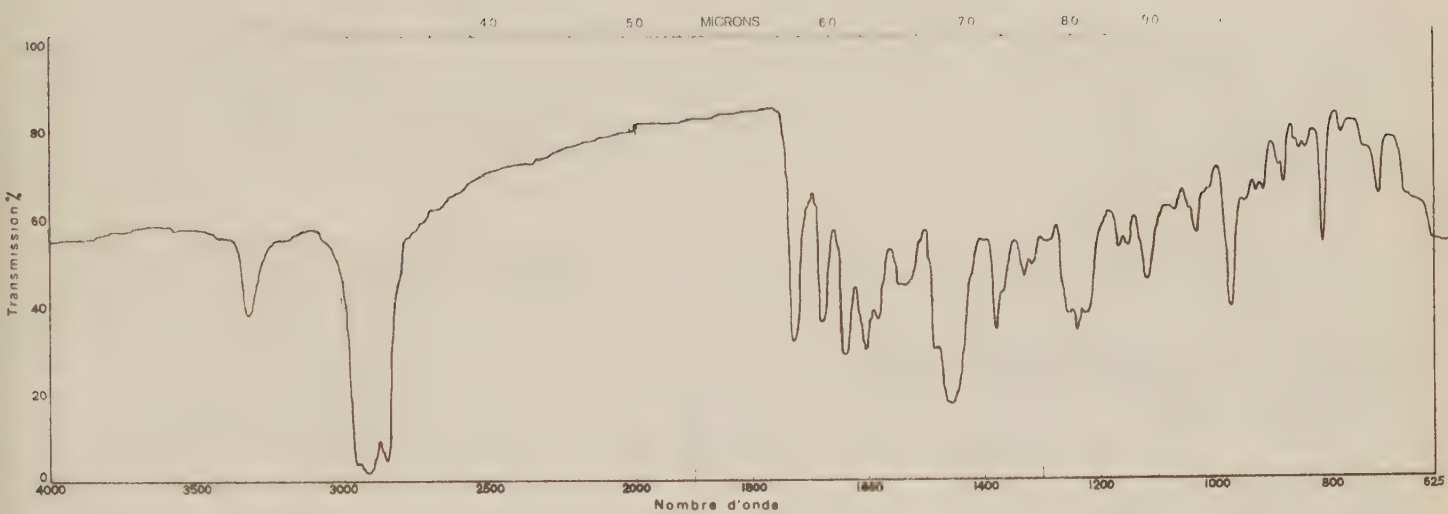
A- L'ALCALOÏDE LBX

Il recrystallise du mélange méthanol/acétone. Sa masse moléculaire, déterminée par spectrométrie de masse ($M^+ = 449$), correspond à la formule $C_{26}H_{31}N_3O_4$, soit 12 unités de masse de plus que la lunarine, 1.

Ses constantes physiques sont : F = 250°C avec décomposition ; $[\alpha]_D^{20} = + 201^\circ$ (CHCl₃).

On note sur son spectre IR (planche 7), une forte bande à 1730cm⁻¹, imputable à une fonction cétonique, deux bandes amides à 1680 et 1550cm⁻¹, deux bandes d'insaturation éthylénique à 1640 et 975cm⁻¹.

Planche 7



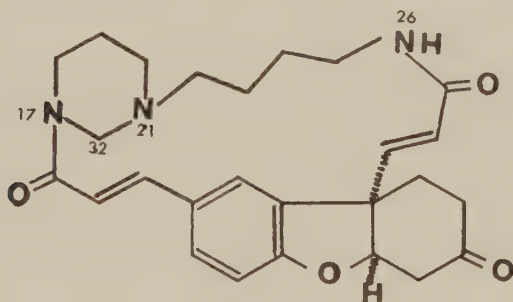
Son spectre UV montre trois maximums à 225, 303 et 325m μ en milieu neutre ; peu modifié en milieu acide (maximums à 227, 307 et 330m μ), il subit, en milieu alcalin, un profond remaniement se traduisant par l'apparition d'un nouveau maximum à 387m μ , en plus des 3 maximums persistant à 227, 303 et 325m μ .

Son spectre de RMN (planche 7) fait apparaître, dans la zone comprise entre 5 et 8ppm, des signaux très proches de ceux observés pour la lunarine elle-même, pour les protons éthyléniques en position 14, 15, 28 et 29, les protons benzéniques en 9, 11 et 12 et le proton angulaire en 2. Seules différences notables, la disparition du proton à 8,9ppm attribué au proton amidique en 17 et l'apparition d'un multiplet correspondant à 2 protons à 4,1ppm.

Ces données spectrales et les résultats obtenus dans les réactions de méthylation précédemment décrites ont permis d'établir la structure de ce nouvel alcaloïde.

Il est en tous points comparable au produit obtenu par action de l'aldéhyde formique en milieu acétique sur la lunarine.

C'est pourquoi la structure proposée pour LBX est la suivante* :



29

B - L'ALCALOÏDE LBY

Il cristallise du mélange méthanol/éther. Il correspond à la formule brute $C_{25}H_{33}O_4N_3 \cdot 2H_2O$. Ses constantes physiques sont : F = 268-273°C ; $[\alpha]_D^{20} = +142^\circ$ (éthanol).

Son spectre IR présente deux bandes d'insaturation éthyléniques à 970 et 1640cm⁻¹, deux bandes amides à 1550 et 1660cm⁻¹, une bande NH entre 3270 et 3290 cm⁻¹, une bande OH à 3440cm⁻¹. La bande caractéristique d'une fonction cétone, présente dans tous les autres alcaloïdes de la lunaire, n'existe pas ici.

* - Nous tenons à remercier ici E.W. WARNHOFF (28) dont les suggestions nous ont amenée à revoir les structures des alcaloïdes LBX et LBZ telles que nous les avons précédemment formulées (13).

On note sur le spectre UV 3 maximums à 226, 298 et 320m μ qui ne sont pas modifiés de façon très sensible, tant en milieu acide qu'en milieu fortement alcalin.

Le spectre de RMN présente dans la zone comprise entre 4,5 et 9ppm des signaux attribuables, comme dans la lunarine, aux protons éthyléniques en 14, 15, 28 et 29, aux protons benzéniques en 9, 11 et 12, au proton angulaire en 2 et au proton amidique en 17.

Ces différents résultats ont permis d'identifier l'alcaloïde LBY comme étant le lunarinol II, 4.

C - L'ALCALOÏDE LBZ

Il n'a pu être obtenu cristallisé. Il répond à la formule brute $C_{26}H_{33}O_4N_3$ ($M^+ = 451$). Son spectre IR (planche 8) traduit l'absence de toute fonction cétonique. Il présente 2 bandes amides à 1670 et 1550cm $^{-1}$ et 2 bandes d'insaturation éthylénique à 1640 et 970cm $^{-1}$.

Sur son spectre de RMN (planche 8), tous les signaux attribués aux protons éthyléniques en 14, 15, 28, 29, benzéniques en 9, 11, 12 et au proton angulaire en 2 sont présents mais on note la disparition du signal attribué au proton porté par l'N amidique en 17.

Ces résultats ont permis de prouver l'identité de cet alcaloïde :

- d'une part avec le produit minoritaire obtenu lors de la réduction de LBX par le borohydrure de sodium ;
- d'autre part avec le produit résultant de l'action de l'aldéhyde formique en milieu acétique sur le lunarinol II.

La structure proposée pour LBZ est donc 30 :

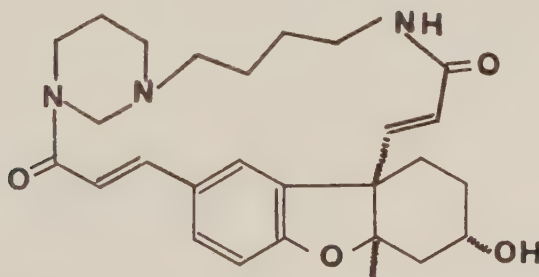
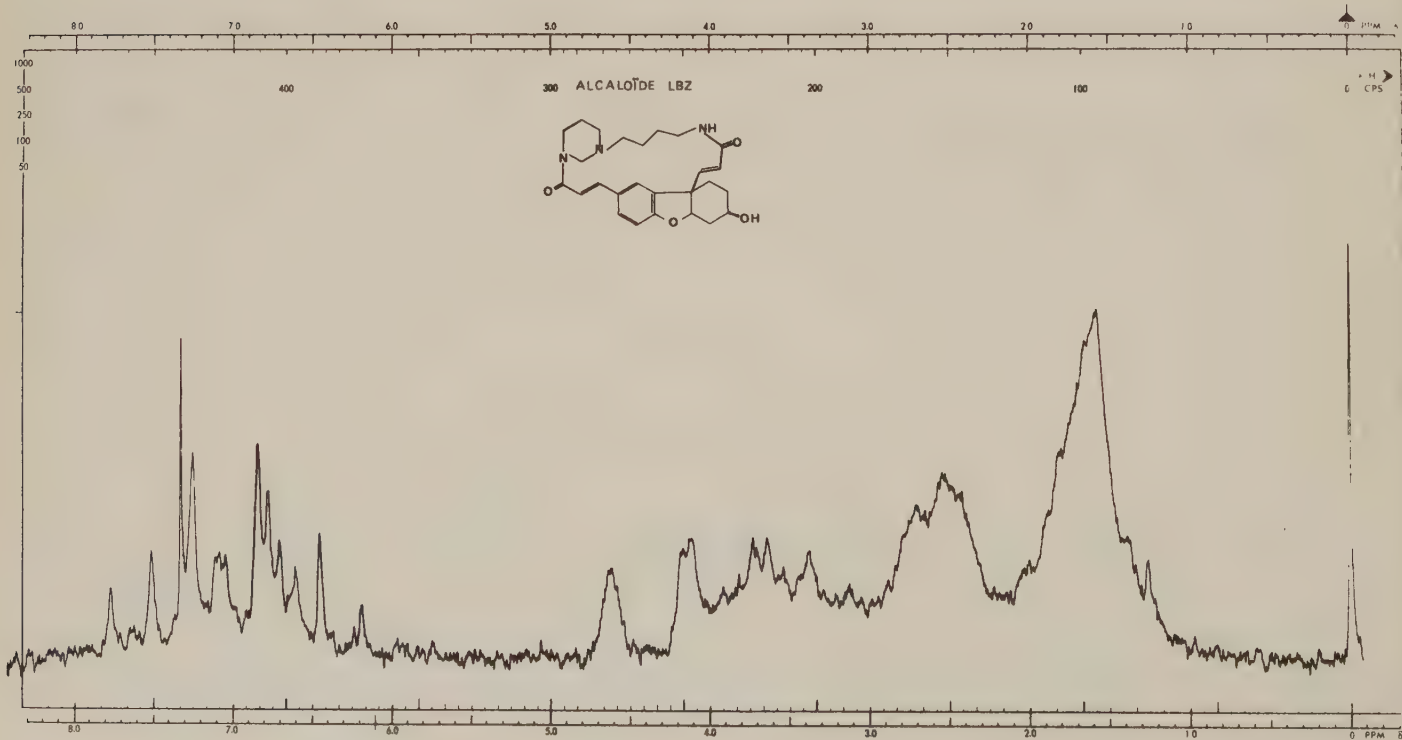
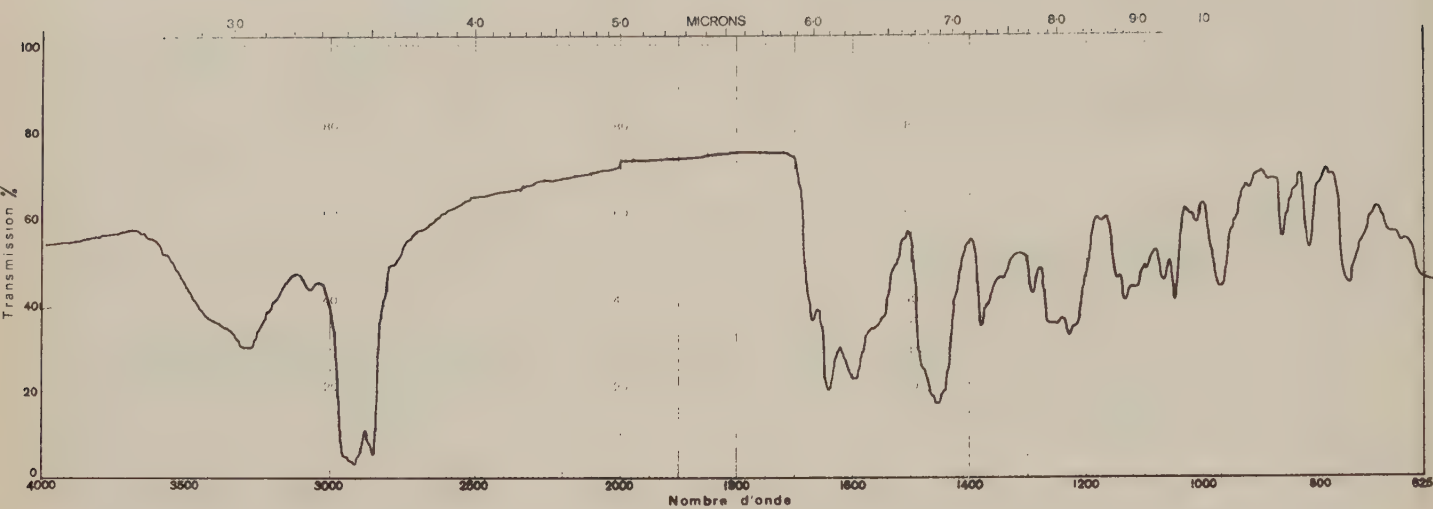


Planche 8



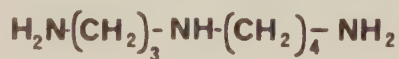
CHAPITRE IV

ÉTUDE STRUCTURALE DE LA LUNARIDINE ET DE LA NUMISMINE

A - LA LUNARIDINE

Isolée en 1954 par H.G. BOIT (¹⁰), la lunaridine est un isomère de la lunarine, répondant, comme celle-ci, à la formule brute $C_{25}H_{31}O_4N_3$. M.-M. JANOT et J. LE MEN (¹¹) l'isolent à leur tour en 1956 et en précisent certains caractères spectrographiques, notamment IR et UV.

L'étude en a été reprise afin d'en déterminer la structure : il a d'abord été procédé à la dégradation de la molécule par fusion alcaline ; réalisée selon le procédé utilisé pour la lunarine, 1, par P. POTIER (¹⁷), elle a permis d'isoler la spermidine, 31, identifiée par comparaison avec un échantillon authentique : spectre IR, chromatographie en phase gazeuse ; spectres IR et de RMN des dérivés triacétylés.

31

La mesure des pouvoirs rotatoires a permis d'éliminer la possibilité d'une isomérisie optique :

$$[\alpha]_D \text{ lunarine} = + 344^\circ \text{ (éthanol)}$$

$$[\alpha]_D \text{ lunaridine} = + 267^\circ \text{ (éthanol)}$$

	LUNARINE	LUNARIDINE
PF	238 -240° C (tube)	> 2 65° C (Kofler)
IR (nujol)	3290cm ⁻¹ (NH) 1725cm ⁻¹ (cétone) 1660cm ⁻¹ { 1540cm ⁻¹ {amides 1615cm ⁻¹ {insaturation 970cm ⁻¹ {éthylénique)	3270cm ⁻¹ 1730cm ⁻¹ 1675cm ⁻¹ 1540-1580cm ⁻¹ 1630cm ⁻¹ 980cm ⁻¹
UV (éthanol)	$\lambda_{\max}$ m μ (log ϵ) <u>milieu neutre</u> : 226(4,41) ; 296(4,35) ; 317(4,25) <u>milieu acide</u> : 225(4) ; 300 (4,5) ; 317(4,34) <u>milieu alcalin</u> : 312(4,04) ; 368(4,5)	<u>milieu neutre</u> : 225(4,33) ; épaut ^t 290(4,22) ; 297(4,26) ; 317(4,16) <u>milieu acide</u> : 225(4,33) ; épaut ^t 290(4,2) ; 299(4,25) ; 318(4,15) <u>milieu alcalin</u> : 316(3,93) ; 369(4,33)
RMN (DMSO)	H en 2 <u>m</u> H en 9 <u>s</u> H en 11 <u>d</u> H en 12 <u>d</u> H en 14 <u>d</u> H en 15 <u>d</u> H en 28 <u>d</u> H en 29 <u>d</u> H en 17 <u>m</u> H en 26 <u>m</u> J=8cps J=16cps J=15,5cps	5,10ppm 7,39ppm 7,30ppm } 6,80ppm } J=8cps 7,36ppm } 6,14ppm } J=15cps 6,48ppm } 6,91ppm } J=15,5cps 8,2 ppm 7,96ppm

m = multiplet ; d = doublet ; s = singlet

m = multiplet ; d = doublet ; s = singlet

L'examen des spectres IR, UV et de RMN fait apparaître de grandes analogies entre les deux alcaloïdes (tableau VII).

L'étude du spectre de RMN (planche 9) a permis notamment d'éliminer la possibilité d'une isomérisie de double liaison : les constantes de couplage des doublets attribués à des protons éthyléniques sont, comme dans le cas de la lunarine, caractéristiques de composés de type trans ($J=15$ et $15,5\text{cps}$).

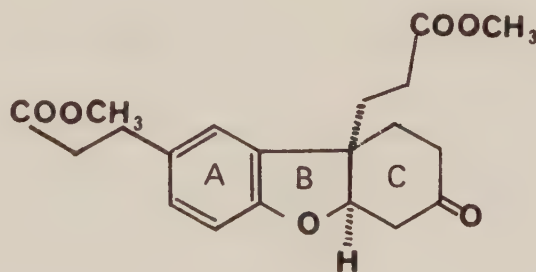
Une photoisomérisation, comparable à celle subie par la lunarine, fournit l'isolarididine, dont le spectre de RMN présente, en particulier, un déplacement et un doublement du proton benzénique (H en 9) et l'apparition de deux doublets (attribués à 2 protons éthyléniques) ayant une constante de couplage nettement inférieure aux précédentes : $J = 12,5\text{cps}$ (caractéristique d'un isomère cis).

D'autre part, l'hydrogénation catalytique de la larididine conduit à deux composés majoritaires résultant, comme dans le cas de la lunarine, de la fixation respectivement de deux et trois molécules d'hydrogène. La tétrahydrolarididine, bien que très proche, est différente de la tétrahydrolunarine, ce qui exclut définitivement une isomérisie de double liaison.

L'hexahydrolarididine, comme l'hexahydrolunarine, présente un caractère phénolique qui permet d'expliquer le déplacement bathochrome observé, en milieu alcalin, sur le spectre UV ; la disparition à $5,10\text{ppm}$ du signal attribué au proton en 2 sur le spectre de RMN est également en faveur d'une forme "ouverte".

D'autre part, l'aspect et la position du signal attribué au proton en 2 sur le spectre de RMN de la larididine rendent peu probable une isomérisie liée à une différence de jonction des cycles B et C.

La mise au point d'une technique de dégradation conservatrice, dont les détails seront donnés plus loin, a permis d'isoler le même composé 32 à partir de la lunarine ou de la larididine :

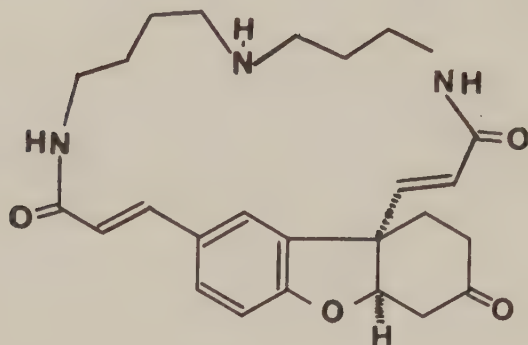


32

confirmant ainsi la jonction cis identique des cycles B et C dans les deux alcaloïdes.

Une seule source d'isomérisie restait donc possible : l'inversion de l'engagement de la chaîne spermidine dans les liaisons peptidiques.

La seule possibilité de structure pour la lunaridine reste donc 33 :



33

B - LA NUMISMINE

Isolée par P. POTIER, J. LE MEN et M.-M. JANOT (12) en 1959, elle répond à la formule brute $C_{25}H_{33}O_4N_3$ ($M^+ = 439$), correspondant à deux atomes d'hydrogène supplémentaires par rapport à la lunarine ou la lunaridine.

Décrite par ces auteurs sous sa forme blanche, elle existe également sous une forme jaune, décrite précédemment par M.-M. JANOT et J. LE MEN (11) sous le nom de lunariamine.

L'absence de pouvoir rotatoire et la disparition entre 5,1 et 5,2ppm du signal attribué au proton en 2 sur le spectre de RMN sont en faveur d'une structure "ouverte".

Il était d'abord nécessaire de s'assurer que, comme dans les cas de la lunarine ou de la lunaridine, la numismine contenait bien de la spermidine.

La fusion alcaline, réalisée dans les mêmes conditions que pour la lunarine et la lunaridine, conduit effectivement à de la spermidine, identifiée comme précédemment.

Le spectre IR présente des bandes caractéristiques des NH, cétone, amides et doubles liaisons éthyléniques.

Le spectre UV comporte, en milieu neutre, trois maximums à 232, 300 et 315m μ , inchangés en milieu acide, mais apparaissant à 238, 314 et 372m μ en milieu alcalin.

Le spectre de RMN (planche 9) présente de grandes analogies avec ceux de la lunarine et de la lunaridine (tableau VIII).

	LUNARINE (DMSO)	LUNARIDINE (DMSO)	NUMISMINE (DMSO)
H en 2	5,23ppm	5,10ppm	pas de signal
H en 9	7,44ppm	7,39ppm	s élargi 6,81ppm
H en 11	7,35ppm	7,30ppm	d dédoublé 7,33ppm
H en 12	6,88ppm	6,80ppm	7,08ppm
H en 14	7,45ppm	7,36ppm	7,35ppm
H en 15	6,23ppm	6,14ppm	5,95ppm
H en 28	6,35ppm	6,48ppm	6,29ppm
H en 29	6,97ppm	6,91ppm	7,09ppm
H en 17	9 ppm	8,2 ppm	8,72ppm
H en 26	7,98ppm	7,96ppm	8,12ppm

m = multiplet ; d = doublet ; s = singulet

TABLEAU VIII

De ces données, il ressort que les doubles liaisons sont trans dans la numismine, comme dans les autres alcaloïdes.

L'obtention des formes "ouvertes" que sont l'hexahydrolunarine et l'hexahydrolunaridine, lors de l'hydrogénation catalytique des alcaloïdes correspondants, incite à hydrogéner la numismine afin d'essayer d'établir une corrélation entre numismine, lunarine ou lunaridine au niveau des produits saturés.

L'hydrogénation catalytique, en présence de charbon palladié, est infructueuse ; par contre, réalisée en présence de platine d'Adams, elle fournit trois composés :

- numismine non hydrogénée ;
- un produit ayant fixé quatre atomes d'hydrogène : la tétrahydronumismine ;
- un produit ayant fixé six atomes d'hydrogène et perdu son groupement cétonique : le tétrahydronumisminol.

La comparaison de la tétrahydronumismine, de l'hexahydrolunarine et de l'hexahydrolunaridine a révélé l'identité des deux premiers composés.

Bien que la forme blanche de la numismine soit une matière première plus commode à manipuler que la forme jaune, pour des raisons de solubilité, les différents spectres ont été réalisés pour les deux composés.

Seuls les spectres IR, réalisés sur les produits solides (mis en suspension dans le nujol) se sont montrés différents.

Il paraît donc vraisemblable que les formes blanche et jaune de la numismine sont des formes tautomères, par exemple :

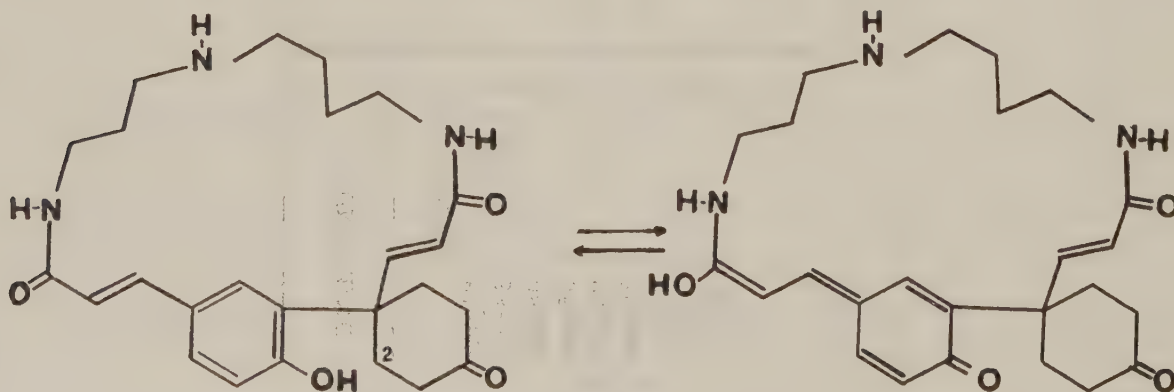
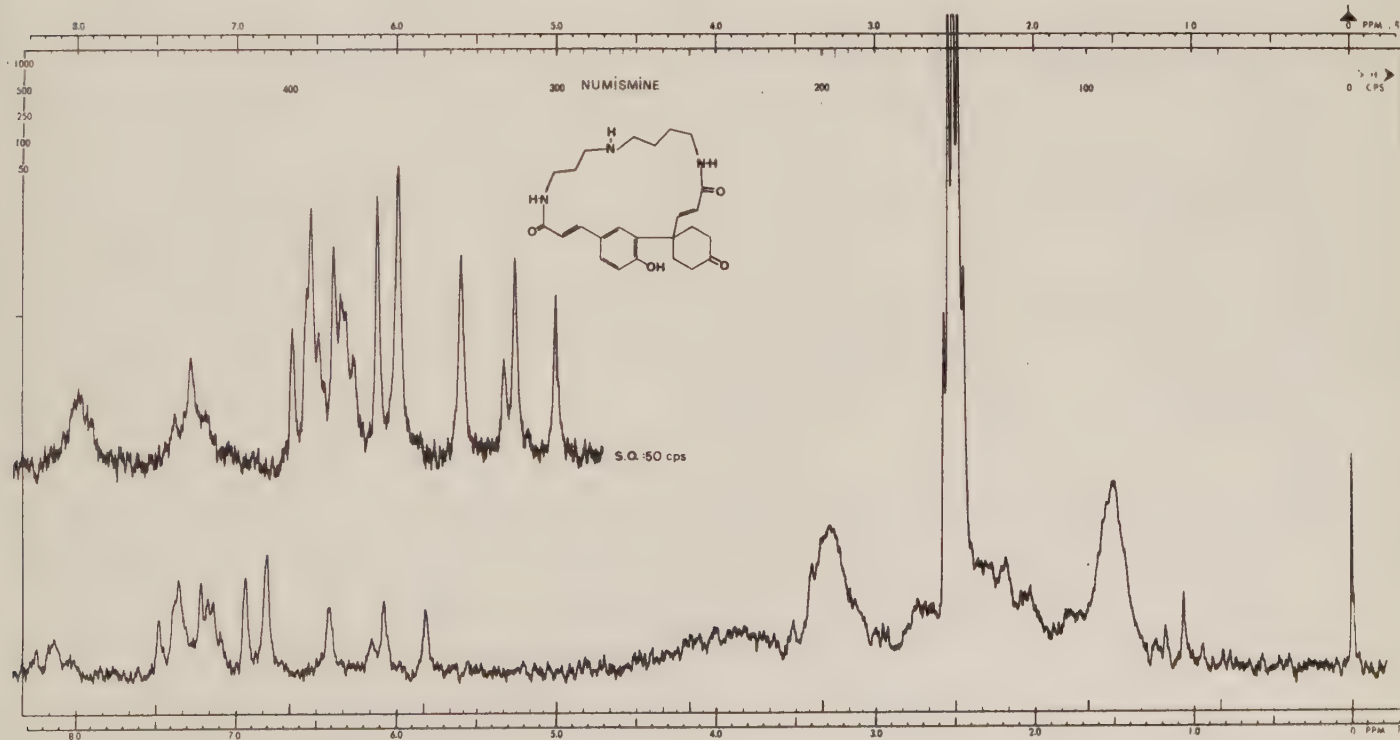
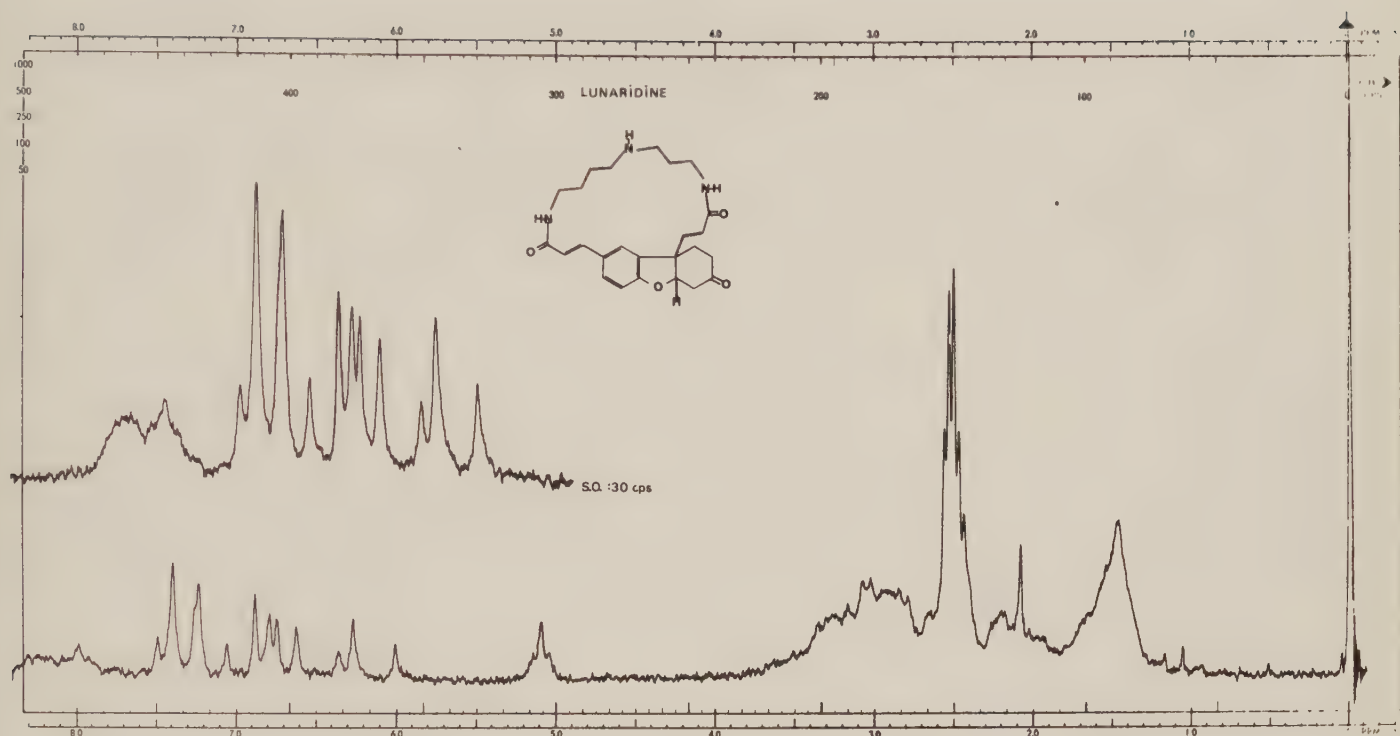


Planche 9



Spectres enregistrés en solution dans le diméthylsulfoxyde deutérié.

FRAGMENTATION DE DERIVES DE LA LUNARIDINE ET DE LA LUNARINE

EN SPECTROMETRIE DE MASSE

L'isomérisie de la lunaridine et de la lunarine, résultant de l'inversion de l'enchaînement de la spermidine, a été confirmée par l'examen des spectres de masse en haute résolution des N-méthyltétrahydrolunarinol et N-méthyltétrahydrolunaridinol et de leurs analogues deutériés $>\text{N-CH}_2\text{D}$.

Les résultats de l'analyse exacte des pics principaux sont réunis dans les tableaux IX et X.

Les fragmentations a, b, c et d sont schématisées sur les planches 10 et 11.

	Fragmentation a			Fragmentation b		
	Masse calculée	Masse trouvée	Intensité relative	Masse calculée	Masse expérimentale	Intensité relative
N-méthyltétrahydrolunarinol	343,20216 $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_2$	343,19968	10%	171,14963 $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{ON}_2$	171,14671 $\xrightarrow{\text{b}'}$ m/e 58 (100%)	11%
N-CH ₂ -D-tétrahydrolunarinol	344,20843 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{DO}_3\text{N}_2$	344,20523	11%	172,15585 $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{DON}_2$	$\xrightarrow{\text{b}'}$ m/e 59 (100%)	12%
N-méthyltétrahydrolunaridinol	357,21780 $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{N}_2$	357,215543	6%	157,13501 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{ON}_2$	$\xrightarrow{\text{b}'}$ m/e 58 (100%)	6%
N-CH ₂ D Tétrahydrolunaridinol	358,224083 $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{DO}_3\text{N}_2$	358,228160	21%	158,140359 $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{DON}_2$	$\xrightarrow{\quad}$ m/e 59 (100%)	16%

TABEAU IX

Les intensités relatives sont exprimées par rapport aux pics de base tels qu'ils apparaissent sur les spectres en basse résolution (planche 12).

	Fragmentation c		Fragmentation d	
	Masse calculée	Masse expérimentale Intensité relative	Masse calculée	Masse expérimentale Intensité relative
N-méthyltétrahydro- lunarinol	331, 20201	331, 20599 $C_{19}H_{27}O_3N_2$	300, 15984	$C_{18}H_{22}O_3N$ 9%
N-CH ₂ D tétrahydro-lunarinol I	332, 20843	332, 20681 $C_{19}H_{26}DO_3N_2$	300, 15984	300, 16381 $C_{18}H_{22}NO_3$ 10%
N-méthyltétrahydro- lunaridinol	345, 217805	345, 216770 $C_{20}H_{29}O_3N_2$	314, 175608	314, 175472 $C_{19}H_{24}O_3N$ 2%
N-CH ₂ D tétrahydro-lunaridinol	346, 224083	346, 221358 $C_{20}H_{28}DO_3N_2$	314, 175608	314, 174781 $C_{19}H_{24}O_3N$ 6%

TABLEAU X

Planche 10

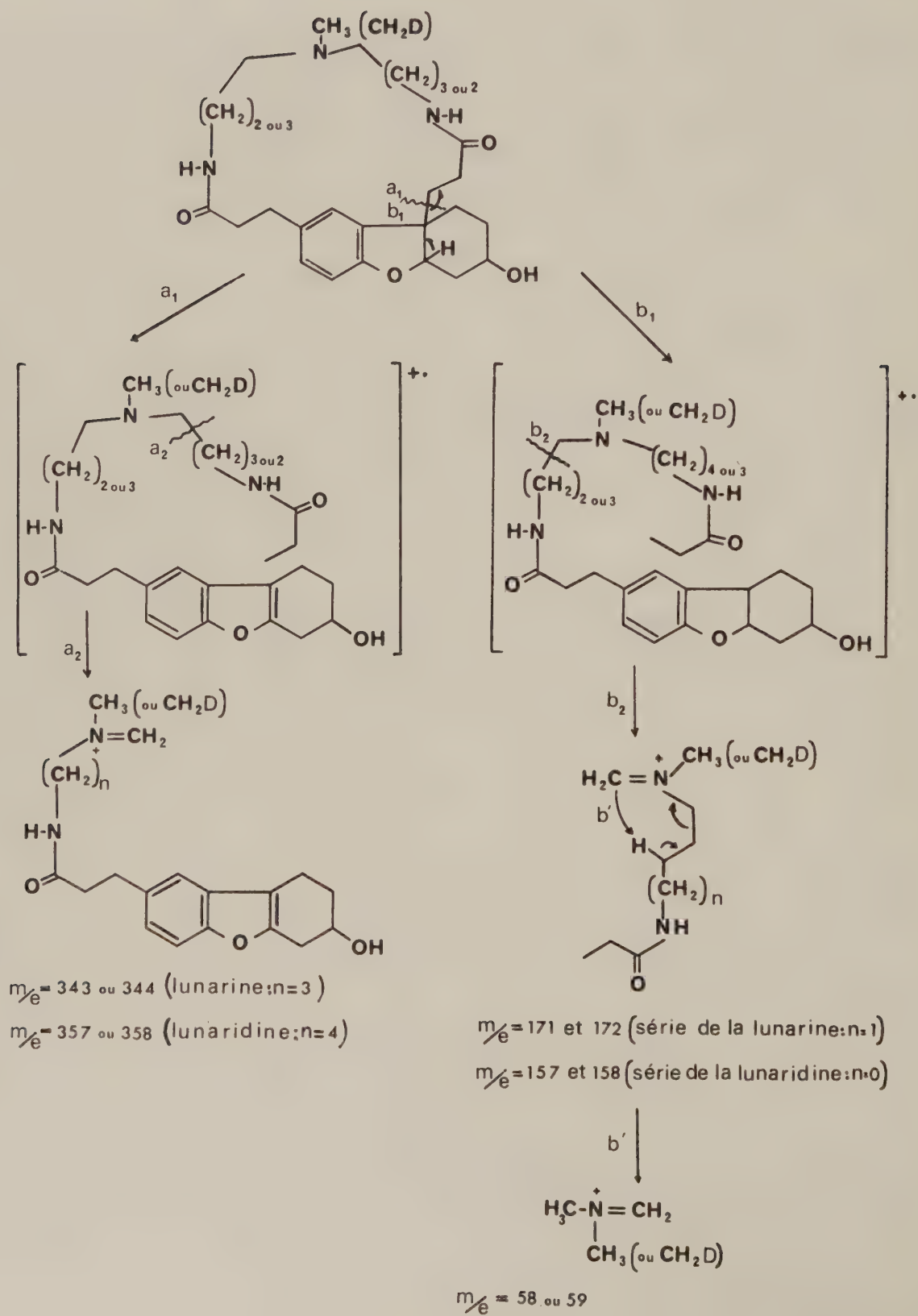
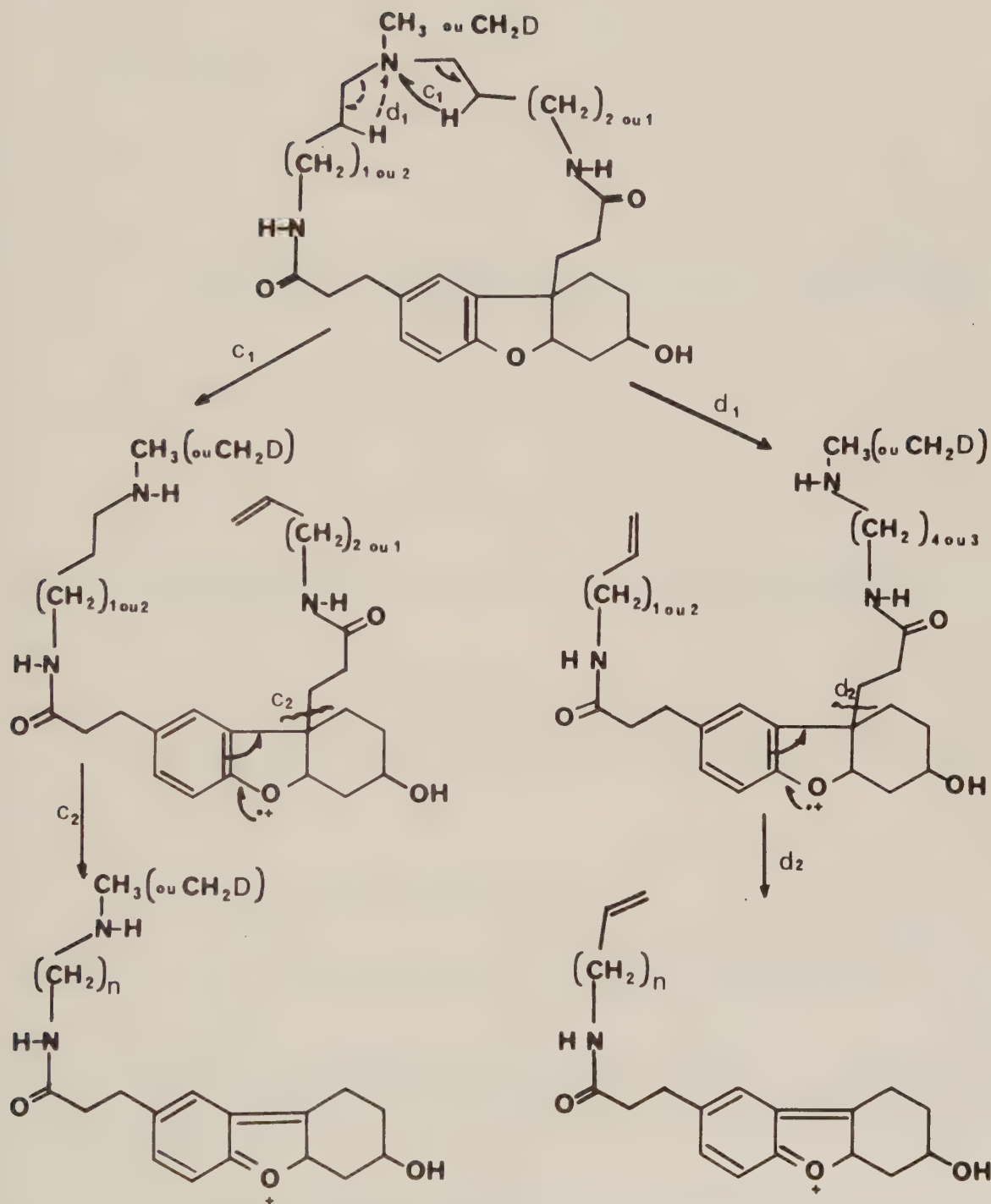


Planche 11

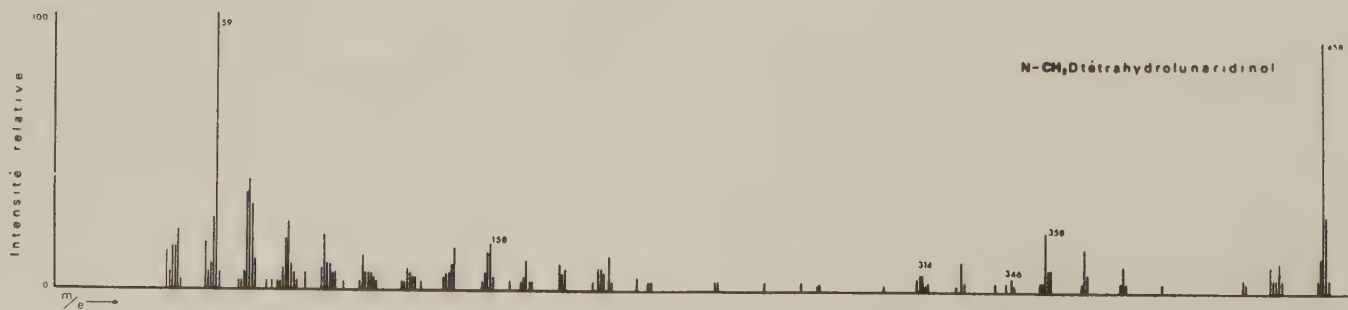


$m/e = 331$ ou 332 (lunarine $n=3$)

$m/e = 345$ ou 346 (lunaridine $n=4$)

$m/e = 300$ (lunarine $n=1$)

$m/e = 314$ (lunaridine $n=2$)



CHAPITRE V

ÉTUDE BIOGÉNÉTIQUE DE LA LUNARINE

La structure de la lunarine, 1, permet d'imaginer trois étapes dans sa biogénèse :

- formation de la spermidine ;
- formation du système hexahydrodibenzofuranne substitué ;
- condensation de ces deux morceaux par formation de deux liaisons peptidiques.

I - FORMATION DE LA SPERMIDINE

Considérée longtemps comme une polyamine d'origine exclusivement animale, la spermidine, 31, est, en fait, présente dans de nombreux végétaux.

Libre, elle a été extraite des feuilles de tomates (⁶⁰), du pollen de *Pétunia* (⁶¹), de toutes les parties du blé à l'exception des racines et des anthères (⁶²), des tubercules de *Helianthus tuberosus* (⁶³), de graines de nombreuses plantes supérieures (⁶⁴), ainsi que de plantes aussi variées que le fraisier, le pommier, le saule, le tabac ou le radis (⁶⁵).

Associée, dans des molécules plus complexes, elle est présente dans quelques alcaloïdes : dans les alcaloïdes de la Lunaire, mais aussi dans ceux de *Equisetum* spp. (^{66,67}) : la palustrine, 35 et la palustridine, 36 ; celui de *Samanea saman* (⁶⁸) : la pithecolobine, 37 ; ceux de *Oncinotis nitida* (⁶⁹) : oncinotine, 38 et isoocinotine, 39 ; et enfin ceux de *Oncinotis inandensis* (⁷⁰) : inandénine A et B, 40 et 41.

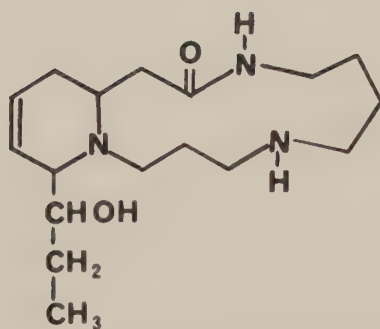
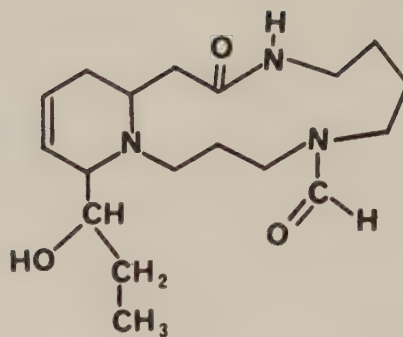
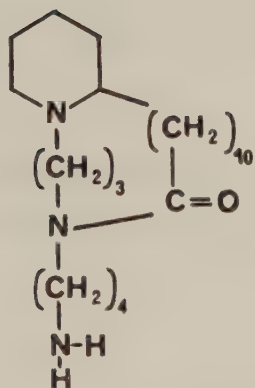
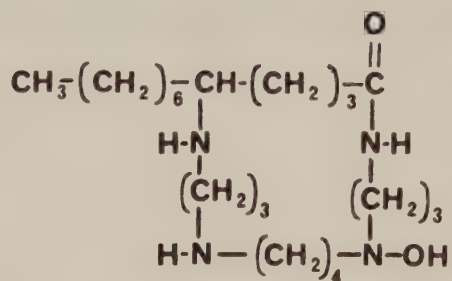
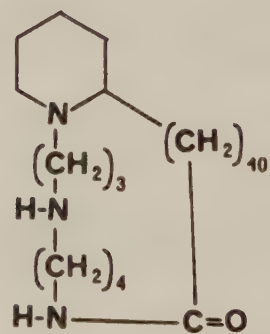
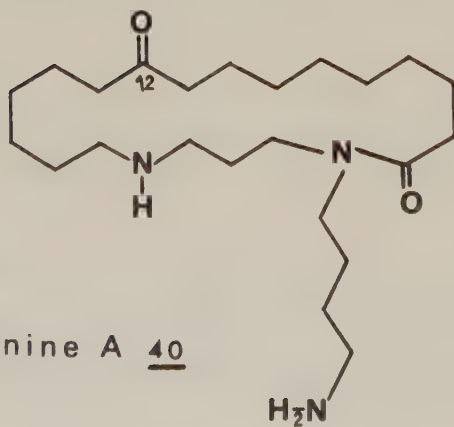
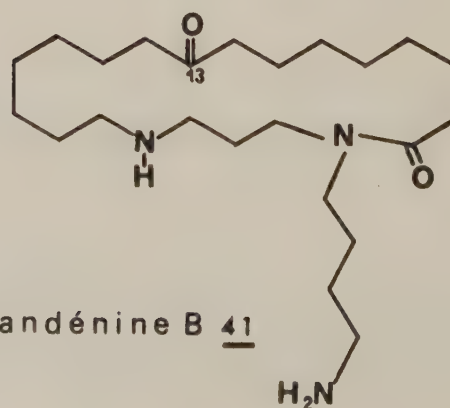
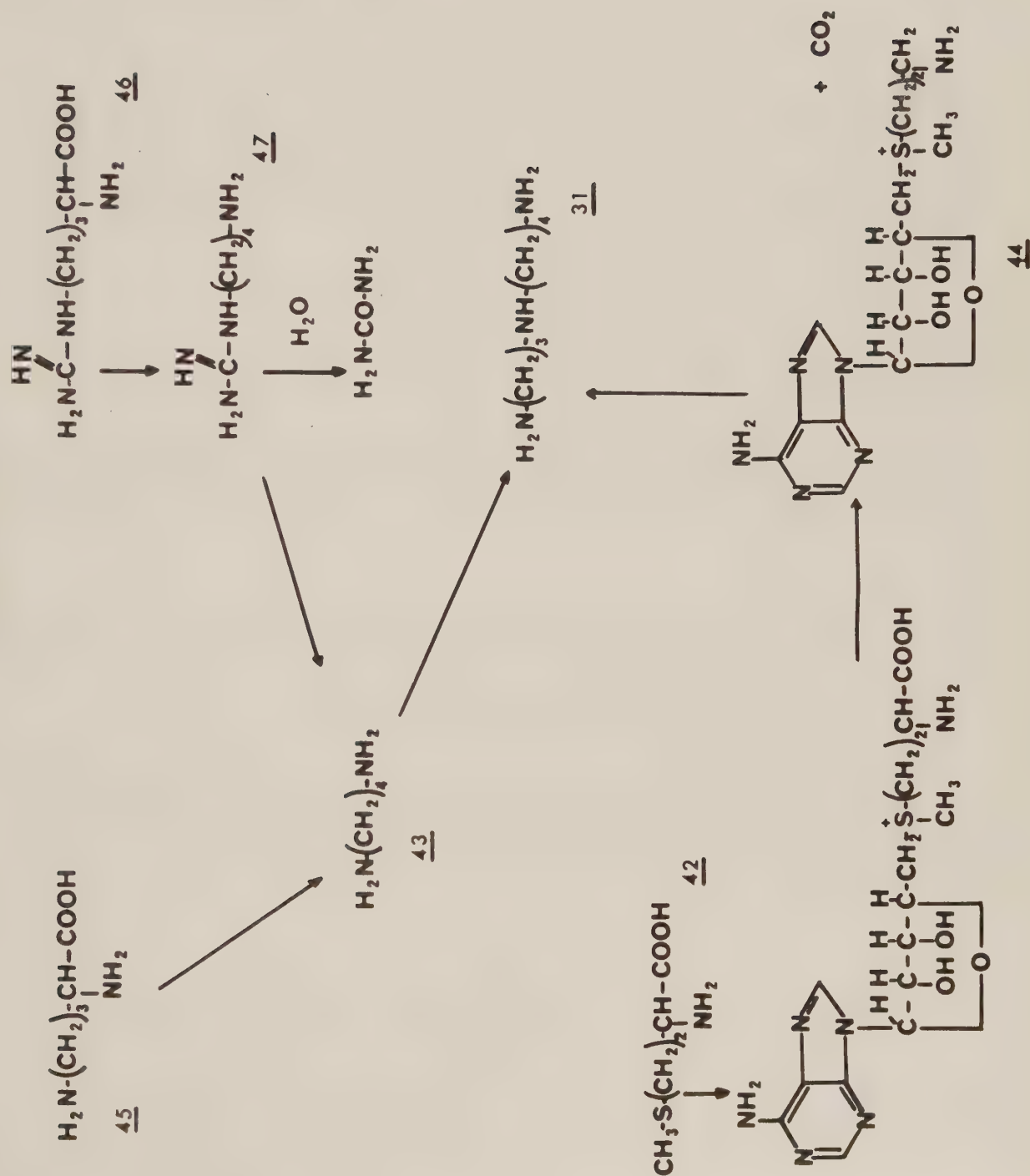
Palustrine 35Palustridine 36Pithécolobine 37Oncinotine 38Isooncinotine 39Inandénine A 40Inandénine B 41

TABLEAU XI



Sa biogénèse a été largement étudiée chez les microorganismes tels que Escherichia coli, Aspergillus nidulans ou Neurospora crassa, ainsi que chez des animaux : embryon de poulet, rat (72) et des Batraciens (72).

La méthionine, 42, et la putrescine, 43, ont été vite reconnues comme intermédiaires importants dans cette biosynthèse (73), la première donnant naissance à la partie propylamine de la spermidine (74), la seconde étant entièrement incorporée pour former la partie diaminobutane (75).

La méthionine, "activée" sous forme de S-adénosylméthionine, est décarboxylée en méthylthioadénosine, 44, et se condense à la putrescine pour donner la spermidine (76).

La putrescine naît de la décarboxylation de l'ornithine, 45, au moins dans les tissus animaux (77) ; chez les microorganismes, deux voies semblent possibles : décarboxylation directe de l'ornithine ou décarboxylation suivie d'hydrolyse de l'arginine, 46, avec formation intermédiaire d'agmatine, 47 (78).

Le schéma de cette biosynthèse figure dans le tableau XI.

Dans les plantes, peu de travaux ont été entrepris à ce jour : les résultats obtenus par T.A. SMITH (65) semblent indiquer une voie biogénétique analogue, au moins en ce qui concerne le rôle de la putrescine.

L'étude que nous avons entreprise a porté sur la formation du deuxième "morceau" de la molécule de lunarine : le système hexahydrodibenzofuranne.

II FORMATION DU SYSTEME HEXAHYDRODIBENZOFURANNE SUBSTITUE

L'hypothèse concernant sa formation s'appuie sur l'analogie structurale existant entre ce système et la cétone de Pummerer, 18.

On sait que la cétone de Pummerer, 18, est produite "in vitro" à partir du p.-crésol sous l'influence d'oxydants tels que le ferricyanure de potassium (59), le perchlorure de fer, le sulfate de fer ou le tétrachlorure de vanadium (52), ainsi qu'en présence d'eau oxygénée et d'extraits enzymatiques (peroxydases) préparés à partir de Crucifères (raifort) (53).

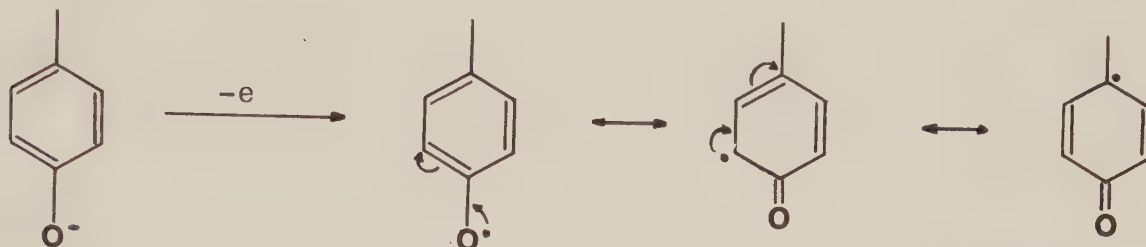


Elle résulte, selon un mécanisme maintenant admis, d'une oxydation phénolique génératrice de radicaux libres (47). Le couplage de ceux-ci deux à deux fournit un composé non radicalaire stable : la molécule dite cétone de Pummerer, 18.

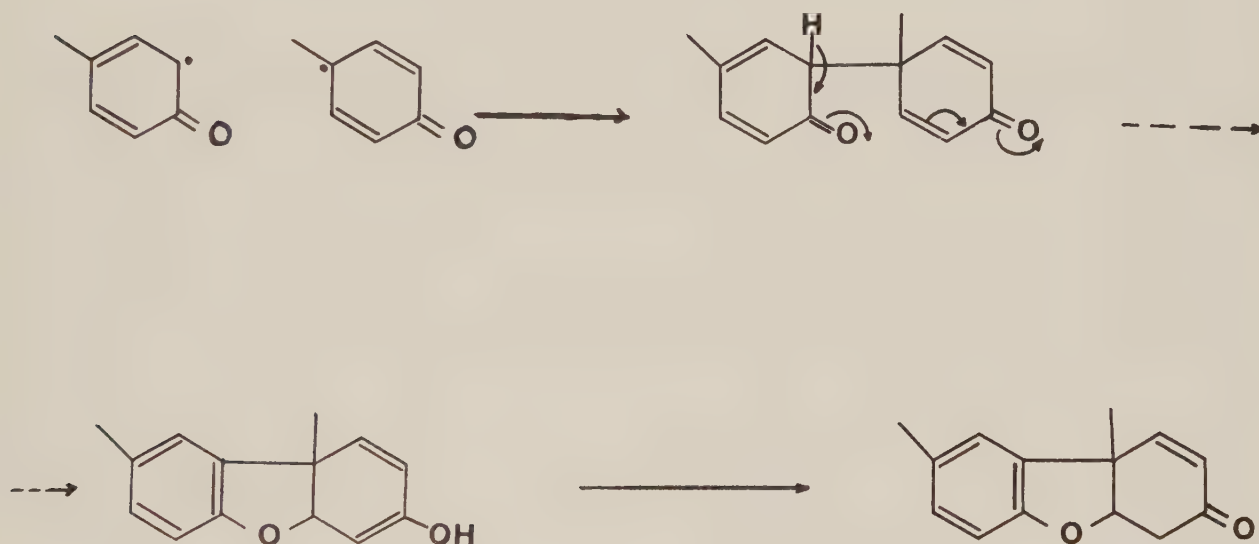
PUMMERER et ses collaborateurs (48) ont, d'ailleurs, été les premiers à reconnaître l'importance de l'oxydation des phénols comme étape intermédiaire de la formation de nombreux composés naturels.

La formation de la cétone de Pummerer peut s'écrire :

1) - Oxydation



2) - Couplage

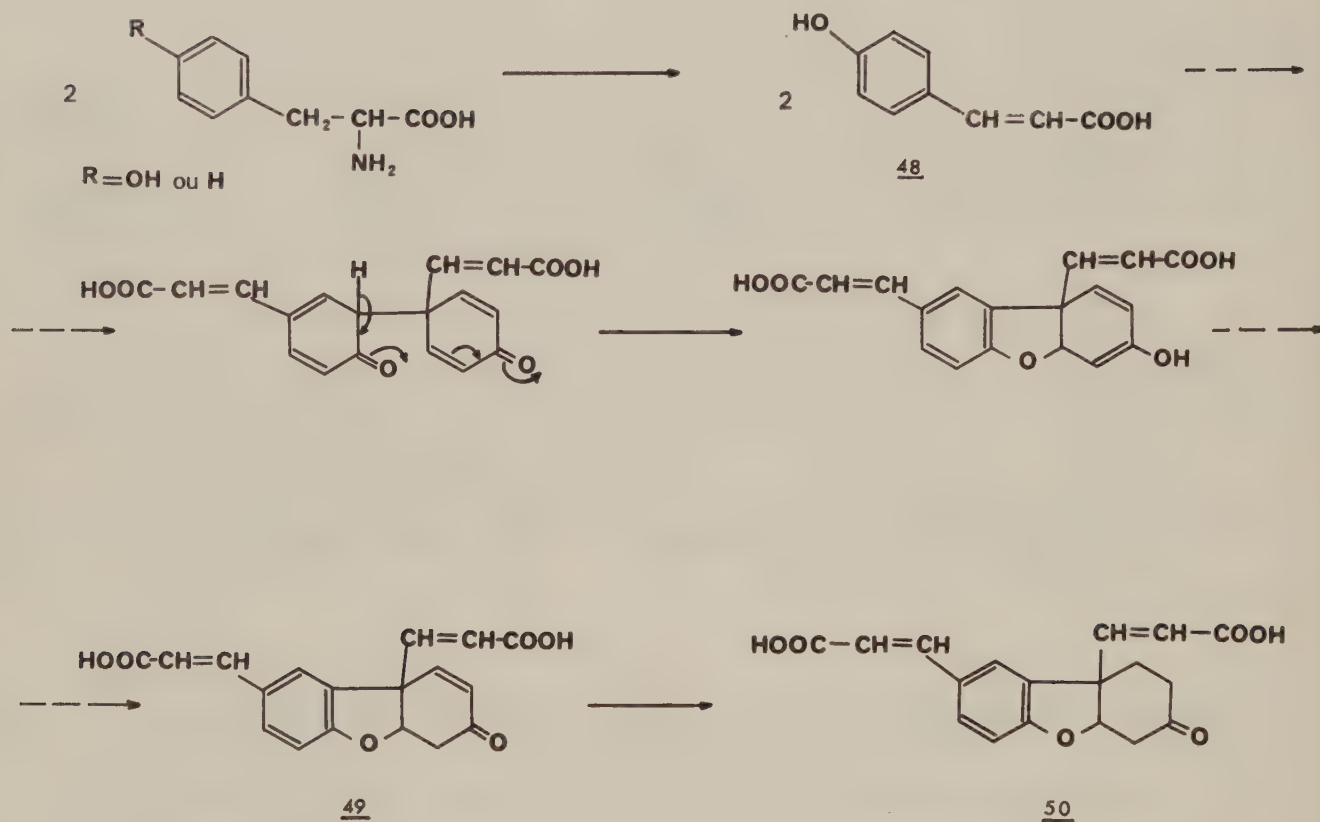


18

Ces deux étapes du "couplage oxydatif" sont à l'origine de nombreux produits naturels.

Dans le cas de la lunarine, il semble probable qu'un couplage oxydatif de deux unités p-hydroxycinnamiques, 48, soit également à l'origine du système hexahydrodibenzofuranne présent dans l'alcaloïde. L'existence, dans d'autres Crucifères, de peroxydases capables de catalyser un tel couplage, est un argument supplémentaire en faveur de cette hypothèse biogénétique.

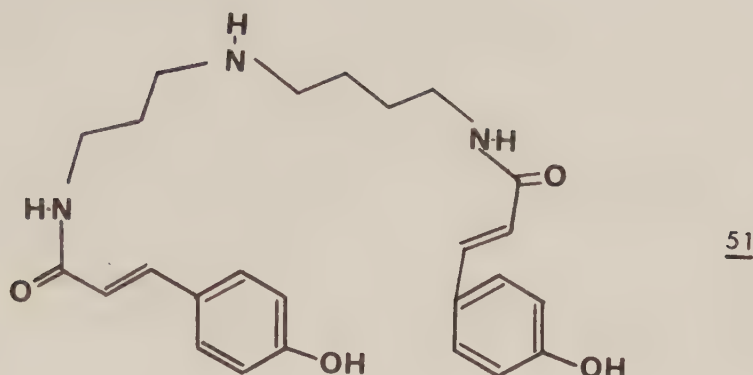
L'acide p-hydroxycinnamique, dérivant lui-même de la tyrosine, ou de la phénylalanine via l'acide cinnamique, on peut imaginer la séquence suivante :



La condensation du composé 50 avec la spermidine donnerait naissance à la lunarine.

III CONDENSATION DU PRODUIT DE COUPLAGE AVEC LA SPERMIDINE

La formation des liaisons peptidiques peut se faire effectivement comme phase terminale de la biogénèse de la lunarine. Cependant, on ne peut exclure une condensation plus précoce de la spermidine, avec l'acide p-hydroxycinnamique, donnant naissance à un composé du type 51, sur lequel se ferait le couplage oxydatif.



Seul l'isolement de composés intermédiaires tels que 49, 50 ou 51 permettrait de préciser l'ordre des étapes aboutissant à la formation de la lunarine, 1.

L'étude entreprise s'est limitée à démontrer l'existence du couplage oxydatif.

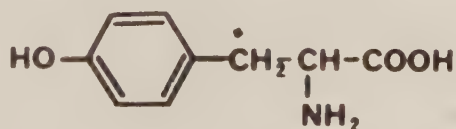
La plante étudiée étant bisannuelle et les alcaloïdes ne se trouvant que dans les graines, nous avons d'abord cherché à savoir si ces alcaloïdes étaient encore présents au moment de la germination. A la suite des résultats positifs obtenus, un essai préliminaire d'incorporation a été effectué au moment de la germination, afin de savoir s'il y avait encore formation de la lunarine à ce stade. Les résultats obtenus avec la (+) phénylalanine marquée en 3 au ^{14}C ont été peu encourageants.

Les essais suivants ont donc été réalisés à une période tardive de la vie de la plante : au moment de la fructification, c'est-à-dire à la fin de la deuxième année dans le cas de Lunaria biennis.

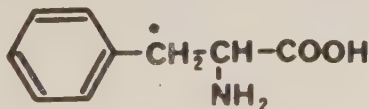
Trois essais d'incorporation ont été conduits :

. les deux premiers (été 1969) ont consisté à tester :

- d'une part, l'incorporation de la (+) tyrosine marquée au ^{14}C en position 3 :



- d'autre part, l'incorporation de la (+) phénylalanine marquée également au ^{14}C en 3 :



. Le troisième (été 1970) a permis de chiffrer l'incorporation de la L-phénylalanine doublement marquée (tritiée sur le noyau en para de la chaîne et marquée au ^{14}C sur tous les carbones) et de déterminer si l'hydroxylation in vivo donnait lieu ou non à une migration du tritium.

Au cours des deux premiers essais, deux lots de plantes ont été utilisés, dans lesquels les graines étaient à des degrés de maturité légèrement différents. Chacun de ces lots a été partagé entre les deux précurseurs présumés. Les plantes portant les graines au degré de maturité le plus avancé ont fourni le taux d'incorporation le plus élevé.

Dans le cas de la (+) phénylalanine, ce taux varie de 0,006 à 0,03%. Dans les deux cas, l'incorporation de la (+) tyrosine s'est révélée insignifiante (taux de $3 \cdot 10^{-4}$ à $9 \cdot 10^{-4}$ %).

Ces résultats sont en faveur de la formation de l'acide p-coumarique, 48, par hydroxylation de l'acide cinnamique issu de la phénylalanine plutôt que par désamination de la tyrosine.

Au cours du troisième essai, l'incorporation de la L-phénylalanine a été de 0,11% avec un rapport $\frac{\text{tritium}}{\text{carbone}} = 3,2$ (rapport fourni = 10).

Les très faibles quantités de lunarine obtenues au cours des deux premiers essais n'ont pas permis d'envisager une dégradation aboutissant à la localisation précise du ^{14}C issu du précurseur. Par contre, le troisième essai, grâce au double marquage, a permis de s'assurer de la spécificité de l'incorporation et d'observer s'il y avait ou non migration intramoléculaire induite par l'hydroxylation ("NIH Shift").

RAPPEL SUR LA MIGRATION INTRAMOLECULAIRE INDUITE PAR L'HYDROXYLATION : "NIH SHIFT"

L'hydroxylation enzymatique d'un substrat aromatique provoque, dans certains cas, la migration du substituant présent sur le noyau là où l'oxygène moléculaire attaque, vers une position adjacente sur le noyau. Cette migration intramoléculaire, induite par l'hydroxylation, a été largement étudiée par G. GUROFF et ses collaborateurs (79) aux National Institutes of Health à Bethesda (Etats-Unis), d'où son appellation "NIH Shift".

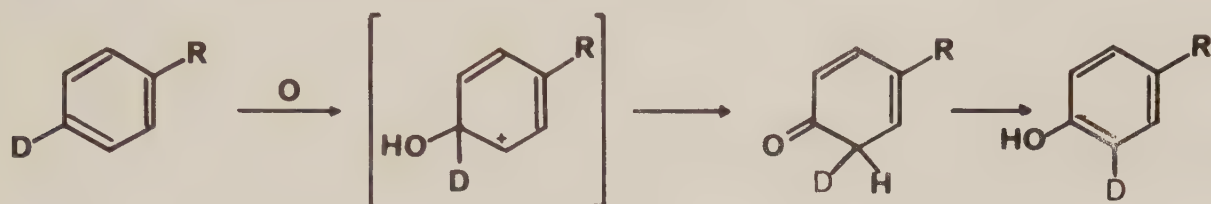
La plupart des travaux entrepris pour mettre en évidence cette migration, pour étudier les conditions dans lesquelles elle se produit et pour tenter d'en éclaircir le mécanisme, a fait appel à des systèmes enzymatiques d'origine bactérienne ou animale, agissant sur des substrats aromatiques marqués spécifiquement soit par du deutérium, soit par du tritium, sur la position à hydroxyler.

En raison du rôle prédominant joué par l'hydroxylation en para dans le métabolisme de la plupart des substances aromatiques, c'est cette réaction qui a donné lieu au plus grand nombre d'études. L'importance de la migration, de même que le taux de rétention, après migration, du deutérium ou du tritium, peut varier de 0 à 90% selon la nature et la position des substituants portés par les substrats aromatiques et, pour certains d'entre eux, selon le pH.

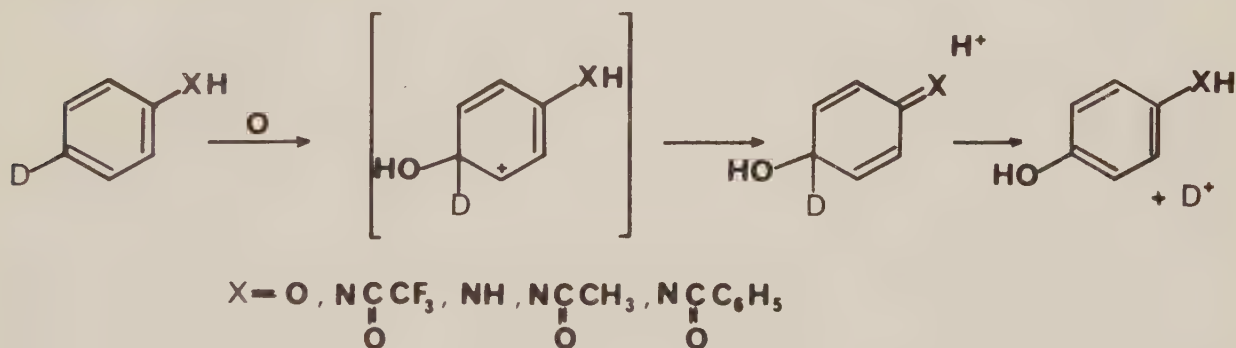
Ces différentes observations ont conduit à proposer un mécanisme faisant appel à la formation d'intermédiaires chargés, dont le mode de stabilisation, différent

selon la nature du substituant porté par le noyau (80), détermine préférentiellement migration ou élimination.

Ainsi, les substrats porteurs d'un substituant donneur ou accepteur d'électrons, mais ne pouvant s'ioniser par perte d'un proton, favoriseraient une migration selon le schéma :

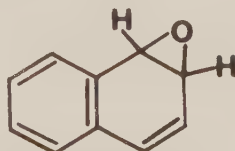


Les substrats porteurs d'un substituant ionisable par perte d'un proton favoriseraient une élimination :



La dépendance de ces derniers substrats vis-à-vis du pH serait liée à ce caractère plus ou moins ionisable.

D'autres intermédiaires ont été proposés pour rendre compte de la migration, notamment des époxydes (81) ; l'un d'eux a été isolé comme intermédiaire obligatoire du métabolisme du naphthalène (82):



Quelques études ont été entreprises concernant l'hydroxylation en ortho ou en méta (83).

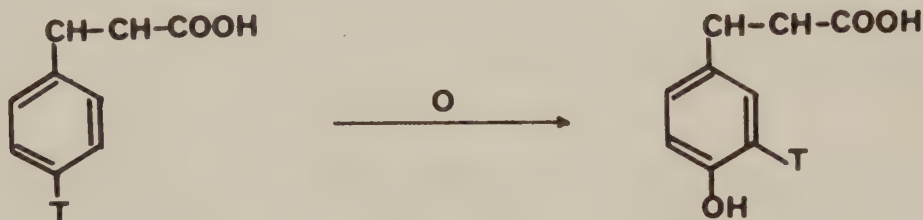
La migration observée dans le cas d'une hydroxylation en ortho est tout à fait comparable à celle observée lors d'une réaction en para. L'hydroxylation en méta semble être moins favorable : la rétention de l'isotope est nettement moindre que dans les cas précédents.

Comme pour l'hydroxylation en para, la nature et la position du (ou des) substituant (s) sur le noyau, semblent avoir une grande importance ; la réactivité relative des substrats vis-à-vis des enzymes hydroxylants apparaît tout-à-fait analogue à celle que l'on observe vis-à-vis des réactifs chimiques produisant des substitutions électrophiles.

Le même type de migration induite par hydroxylation a été mis en évidence dans le règne végétal.

Acide cinnamique et phénylalanine ont été les substrats choisis pour tester cette migration, lors de leur hydroxylation :

. L'acide cinnamique tritié en 4 sur le noyau est transformé en acide p-coumarique tritié en 3 (avec 88,6% de rétention du tritium) par les enzymes extraites de jeunes plants de pois ⁽⁸⁴⁾ ou celles que contiennent les feuilles du Cicer hybrida ⁽⁸⁵⁾.

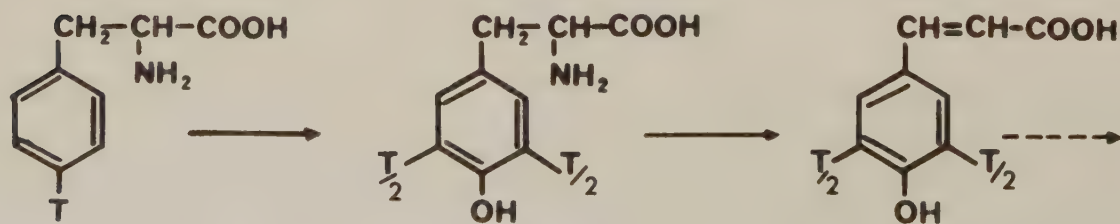


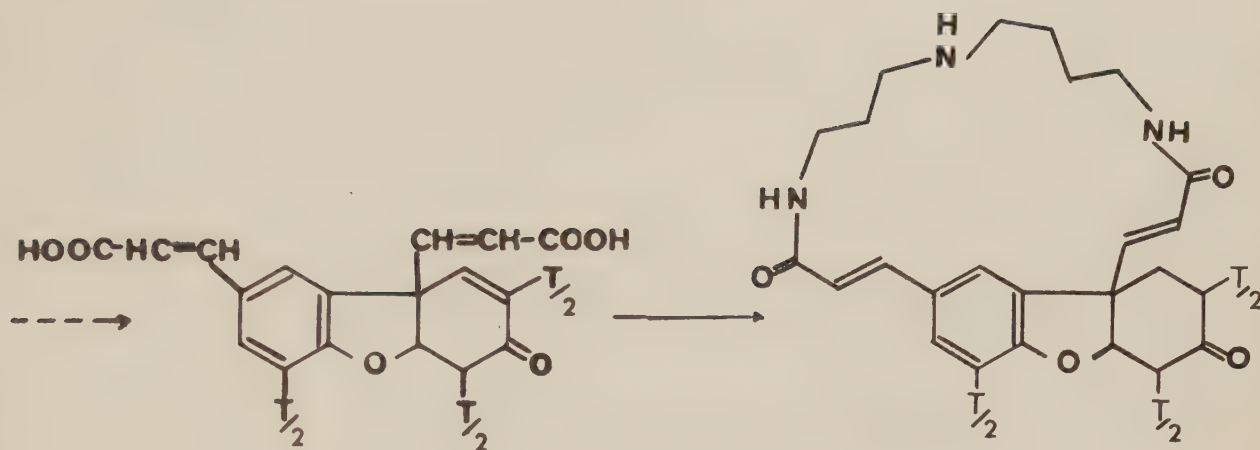
. Ce même acide est incorporé dans les molécules plus complexes des flavonols, isoflavones et flavonosides, avec également une migration intramoléculaire ^(86,87).

. Quant à la phénylalanine tritiée en méta sur le noyau, son hydroxylation sur cette position avant incorporation dans les alcaloïdes benzodiazépines de Penicillium cyclopium se fait avec migration partielle du tritium (35%) ⁽⁸⁸⁾.

Il faut, cependant, remarquer que l'hydroxylation catalysée par la peroxydase extraite du Raifort, plante appartenant, comme la lunaire, à la famille des Crucifères, n'induit pas ce type de migration ⁽⁹⁰⁾.

Il nous a paru intéressant de voir si l'hydroxylation in vivo de la phénylalanine, au cours de la biogénèse de la lunarine, induisait ou non cette migration selon le schéma suivant :

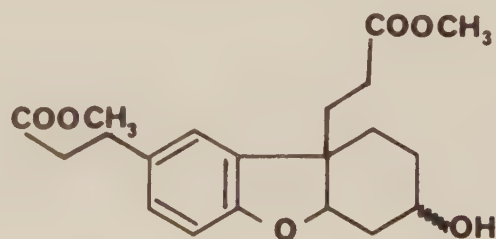




Le rapport tritium retrouvé dans la lunarine est de 3,2 : le rapport théorique, dans le cas d'une migration totale de l'isotope lors de l'hydroxylation, telle qu'elle apparaît dans le schéma ci-dessus, serait de 7,5.

La rétention du tritium est donc de 42,6%. La présence d'une fonction cétone énolisable dans la molécule de lunarine peut expliquer un échange partiel du tritium, en alpha du groupement carbonyle, au cours de l'extraction de l'alcaloïde.

La dégradation de la lunarine marquée, selon un procédé qui sera exposé ci-dessous, conduit à un composé de la forme :



La radioactivité spécifique est pratiquement inchangée. Le rapport tritium subit une légère diminution imputable, probablement, à un faible échange pendant l'hydrogénéation catalytique réalisée sur la lunarine, avant hydrolyse de ses liaisons peptidiques ⁽⁹¹⁾

Ces résultats confirment l'incorporation spécifique de la phénylalanine, comme unité à 9C, dans la partie non azotée de la molécule de lunarine.

Elle est transformée en acide cinnamique qui est lui même hydroxylé in vivo en acide p-coumarique avec migration intramoléculaire de l'H présent sur la position à hydroxyler.

CHAPITRE VI

DÉGRADATIONS DES PRINCIPAUX ALCALOÏDES DE LA LUNAIRE

Les méthodes de dégradation de la molécule de lunarine, appliquées, dans certains cas, à d'autres alcaloïdes extraits de la Lunaire, ont été mises au point tant pour l'analyse structurale que pour les besoins des essais biogénétiques.

. Une technique brutale de dégradation avait été utilisée par P. POTIER (^{16,17}) pour isoler la partie spermidine de la molécule de lunarine, 1 : la fusion alcaline. Cette méthode ne permet pas de retrouver intact le système hexahydrodibenzofuranne : la présence des produits phénoliques, acides, diphényliques caractérisés par P. POTIER et coll. (^{17,27}) atteste des profondes modifications subies par ce système.

Toutefois, cette fusion potassique a encore permis, lors de l'étude structurale de la lunaridine et de la numismine, de mettre en évidence la spermidine dans les molécules de ces deux alcaloïdes (cf. chapitre IV).

. Pour isoler la partie non azotée de la molécule de lunaridine et la comparer à celle issue de la lunarine, pour les besoins des essais biogénétiques, une méthode plus douce de dégradation a dû être recherchée.

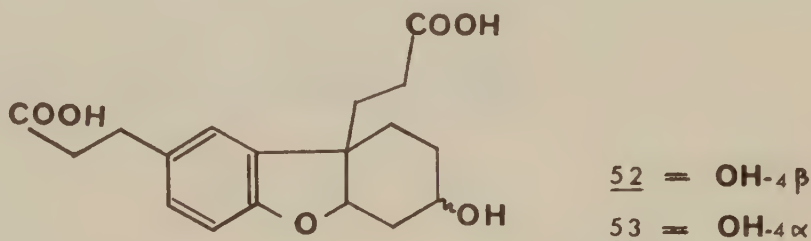
Les différentes étapes en sont les suivantes :

- Réduction de la fonction cétone de la lunarine, 1 (ou de la lunaridine, 33) par le borohydrure de sodium ;

- Hydrogénation catalytique des deux doubles liaisons en C₁₄-C₁₅ et C₂₇-C₂₈ conduisant aux tétrahydrolunarins (ou tétrahydrolunaridins) ;
- Hydrolyse alcaline du mélange de ces alcools saturés, à l'aide d'une solution hydro-alcoolique de soude, environ 2 N, sous pression, à 160-180°C, pendant 16 à 18 h.

La complexité des produits obtenus lorsque la réaction est effectuée sur les lunarins (ou lunaridins) a fait préférer l'emploi des produits saturés.

Du milieu réactionnel alcalin, on extrait, en milieu acide, un mélange des diacides de la forme 52 et 53.



- Ces diacides sont méthylés par le diazométhane : ce sont ces esters méthyliques, purifiés par sublimation, qui ont été utilisés pour chiffrer la radioactivité après dégradation de la lunarine, permettant de localiser les éléments marqués incorporés par la plante sous forme de phénylalanine et confirmant ainsi l'hypothèse de la formation de l'alcaloïde par couplage oxydatif.
- Ces esters méthyliques sont finalement soumis à une oxydation chromique.

Cette dégradation est schématisée dans le tableau XII.

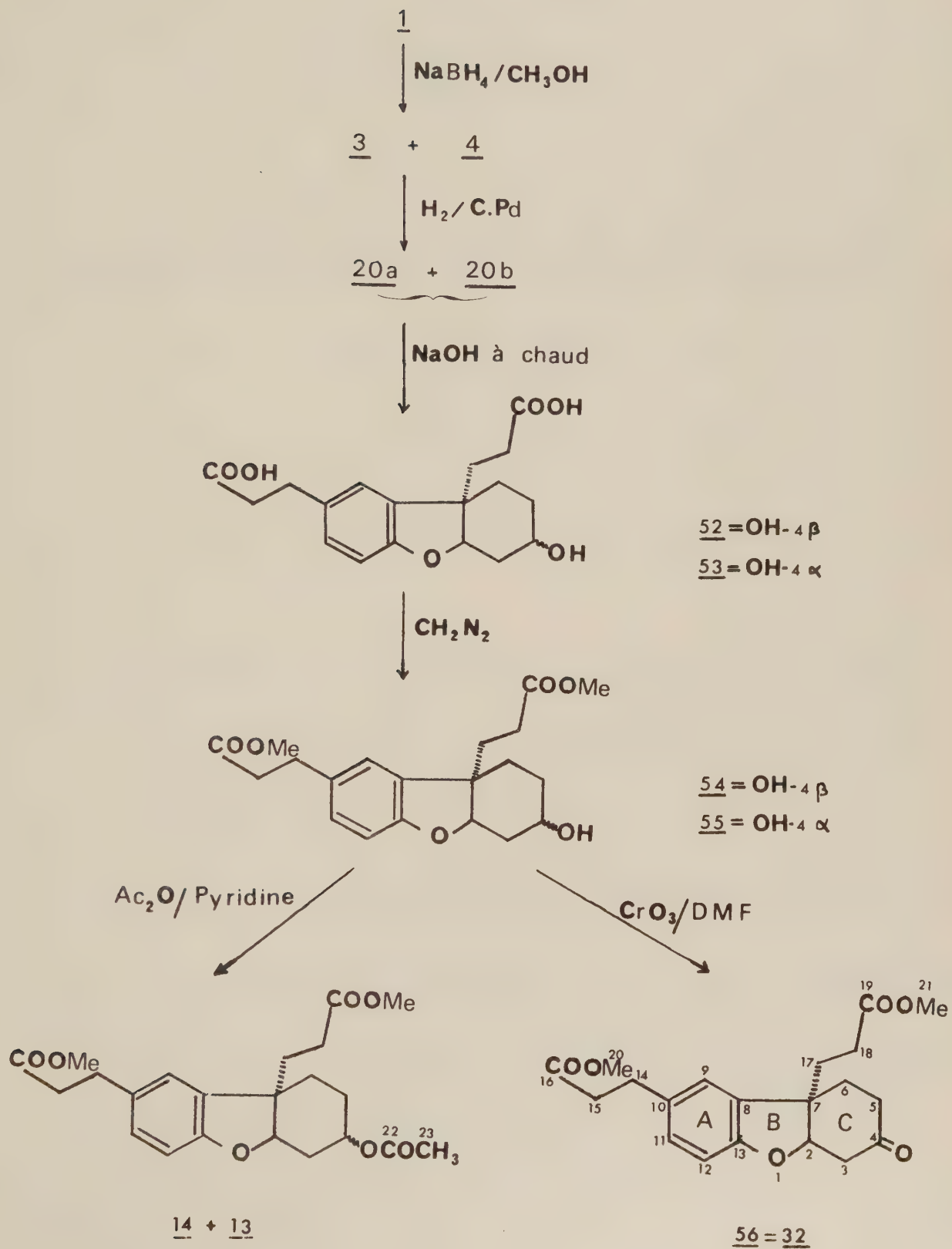
Cette suite de réactions, réalisée sur le tétrahydrolunarinol I, 20a, seul, puis sur le tétrahydrolunarinol II, 20b, seul, a permis d'obtenir séparément les composés 54 et 55 dont les dérivés O-acétylés, 14 et 13 ont servi à déterminer la stéréochimie des lunarins.

Après oxydation chromique des alcools épimères 54 et 55, la lunarine et la lunaridine fournissent le même produit de dégradation, 56 (α D, spectres IR, de RMN, masse identiques) en tous points semblable au produit de synthèse 60.

Ce résultat permet d'exclure pour la lunaridine une isomérisie impliquant les cycles A, B et C.

Enfin, cette dégradation de la lunarine permet d'accéder facilement et avec des rendements satisfaisants à l'ester méthylique hydrogéné du produit résultant du couplage oxydatif de deux unités d'acide p-hydroxy phényl-3 propionique (homologue saturé de l'acide p-hydroxycinnamique, 48). Cette dégradation devient ainsi une source intéressante de matière première pour les essais de synthèse des alcaloïdes de la lunaire.

TABLEAU XII



CHAPÎTRE VII

SYNTHÈSE DES ALCALOÏDES TÉTRAHYDROGÉNÉS DE LA LUNAIRE

La synthèse des alcaloïdes de *Lunaria biennis* Moench a été envisagée en deux temps :

- 1) - protection exclusive de la fonction amine secondaire de la spermidine ;
- 2) - couplage oxydatif :

soit du diamide provenant de l'action de deux molécules du chlorure de l'acide p-hydroxyphénylpropionique sur la spermidine convenablement protégée ;

soit de l'ester méthylique de l'acide p-hydroxyphénylpropionique ; dans ce cas, le couplage est suivi d'une condensation du produit obtenu avec la spermidine protégée.

Cette dernière voie a été préférée à la précédente en raison de la complexité des mélanges obtenus le plus souvent au cours des réactions de couplage oxydatif.

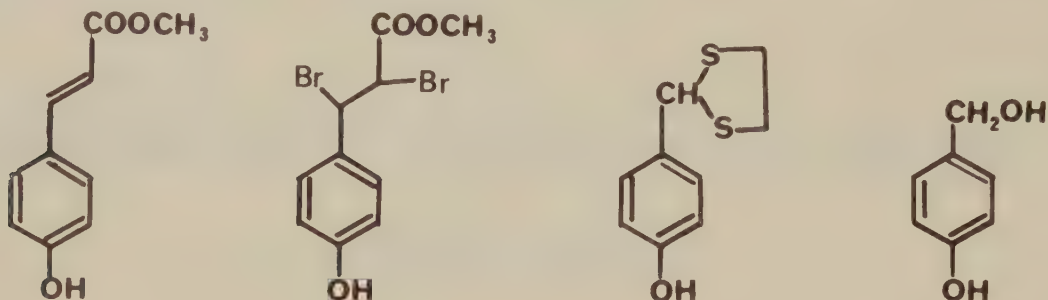
La synthèse projetée comportait donc trois stades principaux :

- Synthèse du système hexahydrodibenzofuranne convenablement substitué ;
- Protection de la spermidine ;

- Formation des deux liaisons peptidiques par condensation du système hexahydrodibenzofuranne avec la spermidine protégée, en solution très diluée pour prévenir les polymérisations.

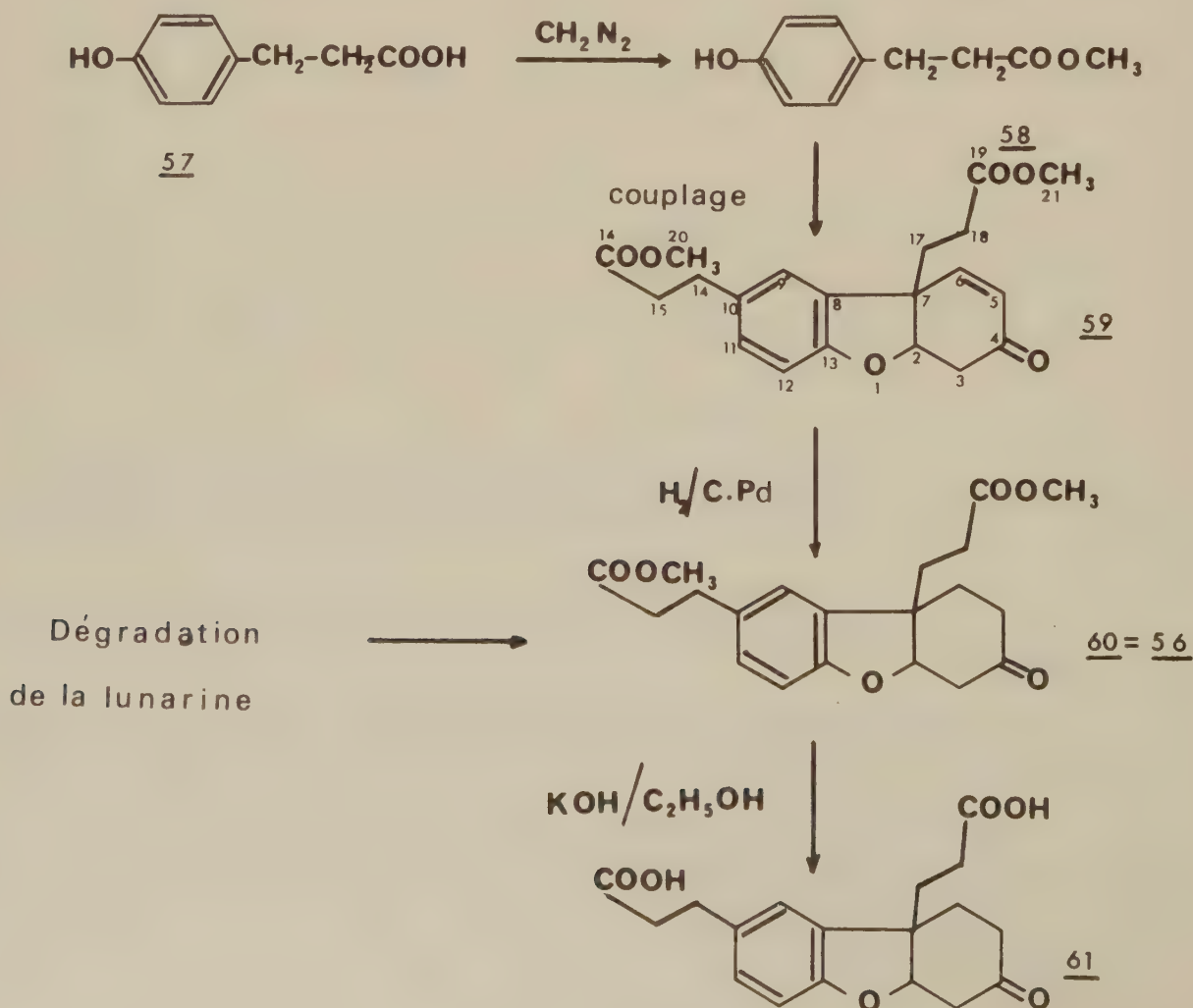
A - SYNTHESE DU SYSTEME HEXAHYDRODIBENZOFURANNE SUBSTITUE

A.D. TAIT (92) a essayé, sans succès, le couplage, sous l'action oxydante du ferricyanure de potassium, de composés phénoliques tels que :



Ses résultats ont été meilleurs lorsqu'il a eu recours à l'action d'une peroxydase pour oxyder le p-hydroxyphénylpropionate de méthyle, 58.

Nous avons repris la même matière première dans les étapes suivantes :



. La méthylation de l'acide p-hydroxyphényl-3-propionique, 57, par le diazo-méthane, fournit quantitativement l'ester méthylique, 58.

. Deux méthodes ont été utilisées pour réaliser le couplage oxydatif de l'ester méthylique précédent :

- méthode chimique d'oxydation par le ferricyanure de potassium, telle qu'elle est décrite par C.G. HAYNES et coll. (57) : addition progressive, à 0°C, d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium à une suspension du composé 58 dans l'eau carbonatée ;

- méthode enzymatique faisant appel aux propriétés de peroxydases extraites du Raifort (53) : l'ester méthylique, en solution dans l'acétone, est ajouté à une solution tamponnée contenant la préparation enzymatique et de l'eau oxygénée.

Dans les deux cas, le produit de la réaction, extrait par le chloroforme, est un mélange complexe.

La séparation des produits de couplage est faite sur plaques préparatives de gel de silice : le rendement en produit condensé pur est de 14% par voie chimique, 11% par voie enzymatique.

Les données spectrales sont en accord avec la structure 59 qui répond à la formule brute $C_{20}H_{22}O_6$ ($M^+ = 358$) ; en effet :

Le spectre IR présente les bandes caractéristiques des esters (1720cm^{-1}) et d'une cétone α, β insaturée (1680cm^{-1}).

Le spectre de RMN fait apparaître les signaux caractéristiques :

des deux méthyles en C-20 et C-21 sous forme de 2 singulets très proches à 3,67 et 3,68ppm ;

du proton angulaire en C-2 sous forme d'un multiplet centré sur 4,82ppm ;

des protons éthyléniques : en C-5 sous forme d'un doublet centré sur 6,02 ppm ($J_{H5-H6}=10,5\text{cps}$) ; en C-6 sous forme d'un doublet dédoublé centré sur 6,44ppm ($J_{H5-H6}=10,5\text{cps}$; $J_{H6-H2}=2\text{cps}$) ;

des protons benzéniques : en C-9 sous forme d'un doublet centré sur 7,06 ppm ($J_{H9-H11}=2\text{cps}$) ; en C-11 sous forme d'un doublet dédoublé centré sur 7,05ppm ($J_{H9-H11}=2\text{cps}$; $J_{H11-H12}=8,5\text{cps}$) ; en C-12 sous forme d'un doublet centré sur 6,74ppm ($J_{H11-H12}=8,5\text{cps}$).

. Ce produit de couplage, 59, est ensuite hydrogéné par voie catalytique en présence de charbon palladié.

Le produit 60 obtenu, purifié par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice, est identique au produit de dégradation, 56, de la lunarine, au pouvoir rotatoire près.

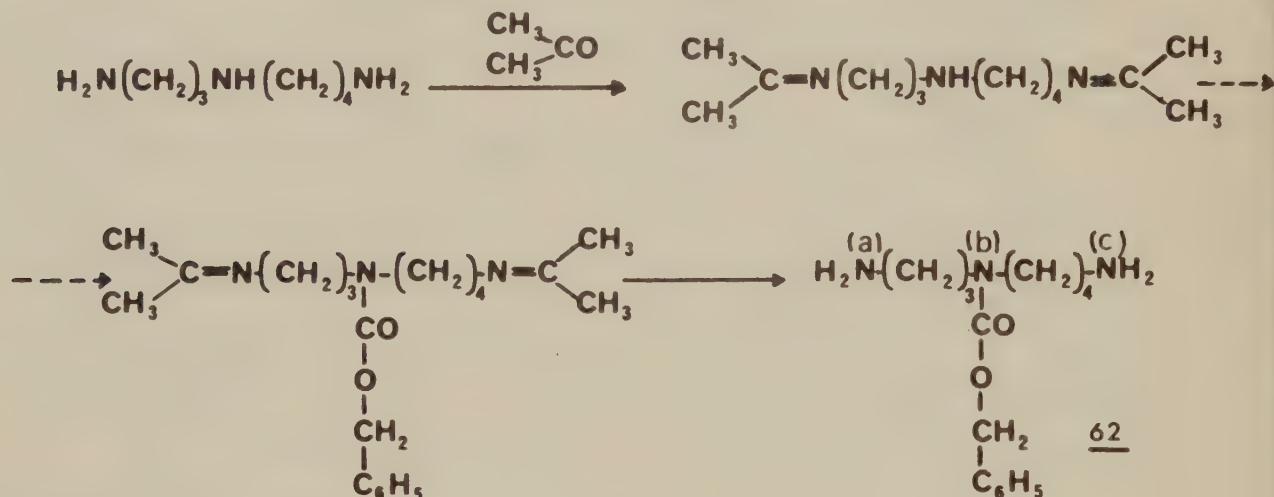
. L'hydrolyse du diester, 60, par la potasse éthanolique à 4% conduit au diacide 61.

B - PROTECTION DE LA SPERMIDINE

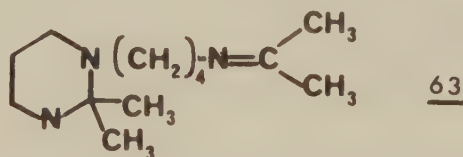
Il est nécessaire de protéger la fonction amine secondaire de la spermidine ou de l'alcoyler, pour réaliser les deux liaisons peptidiques en bout de chaîne.

Divers moyens ont été envisagés :

a) - la formation de groupements isopropylidènes sur les deux amines primaires, suivie de la protection de l'amine secondaire sous forme de dérivé N-benzyloxy-carbonyle, devait conduire à la N_(b)-benzyloxycarbonyl-spermidine, 62, après hydrolyse des groupements isopropylidènes.

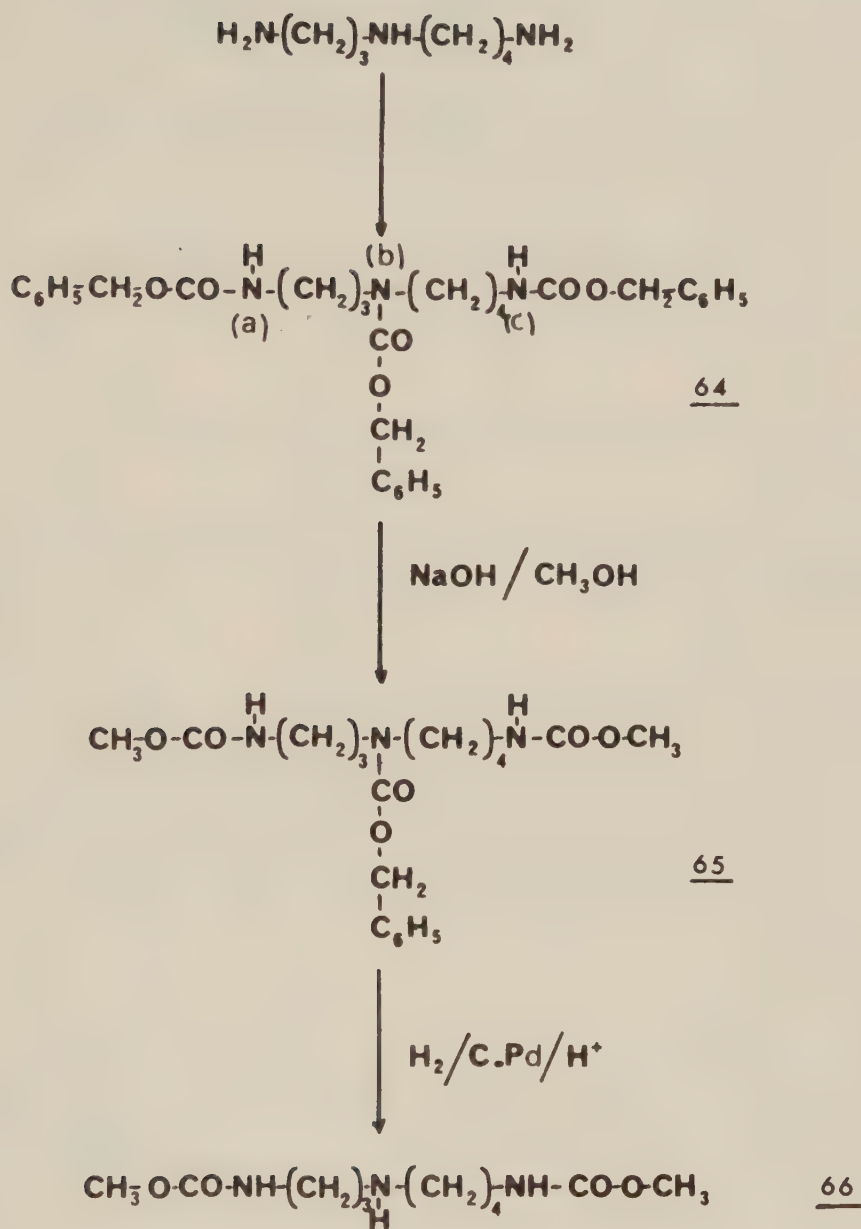


En fait, l'action de l'acétone sur la spermidine conduit à un mélange complexe dans lequel figurent vraisemblablement des dérivés cyclisés du type 63 :

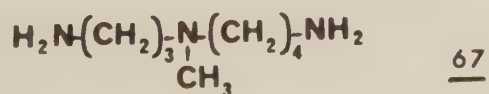


b) - la préparation d'un dérivé tribenzyloxycarbonyl a été effectuée dans l'espoir de libérer sélectivement les fonctions amines primaires.

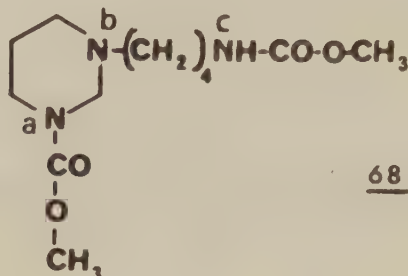
Le traitement de ce dérivé, 64, dans la soude méthanolique à reflux conduit, avec un bon rendement, au dérivé N_(a), N_(c) diméthoxycarbonyl, 65, dont la fonction amine secondaire N_(b) est facilement régénérée par hydrogénolyse.



c) - la méthylation de l'amine secondaire du composé obtenu, 66, a été tentée pour obtenir le dérivé 67, après saponification des deux fonctions uréthanes.



La méthylation par le formol, en présence de borohydrure de sodium ou d'hydrogène et de charbon palladié conduit, de façon prépondérante, au dérivé cyclisé 68.

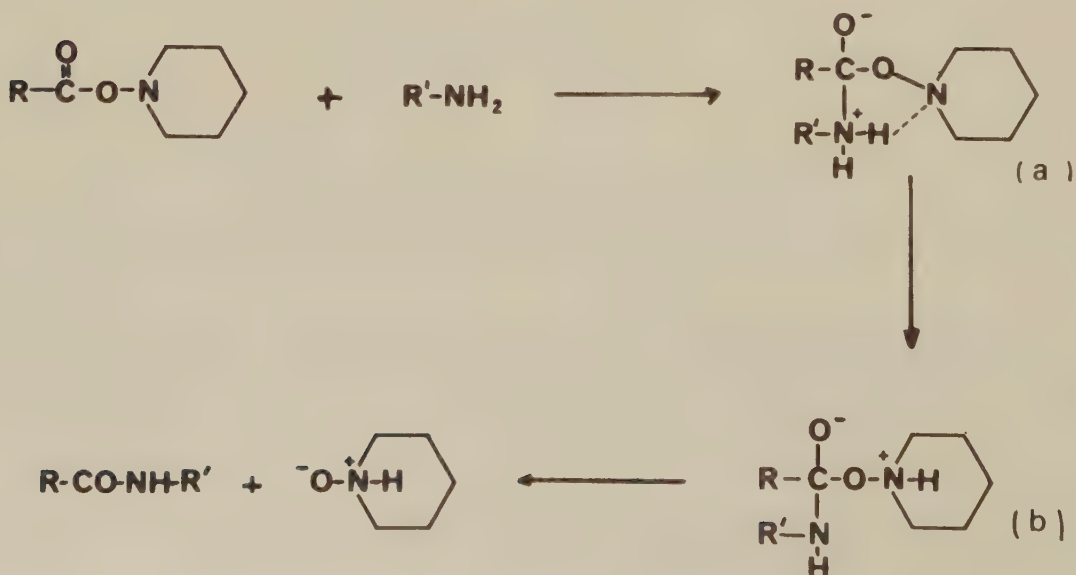


L'attaque de l'immonium intermédiaire par l' $N_{(a)}$ est plus rapide que sa réduction en méthyle.

Devant l'impossibilité de protéger la spermidine, la formation des liaisons peptidiques de la lunarine ne pouvait plus être envisagée d'une façon classique.

C- METHODE DES ESTERS ACTIFS

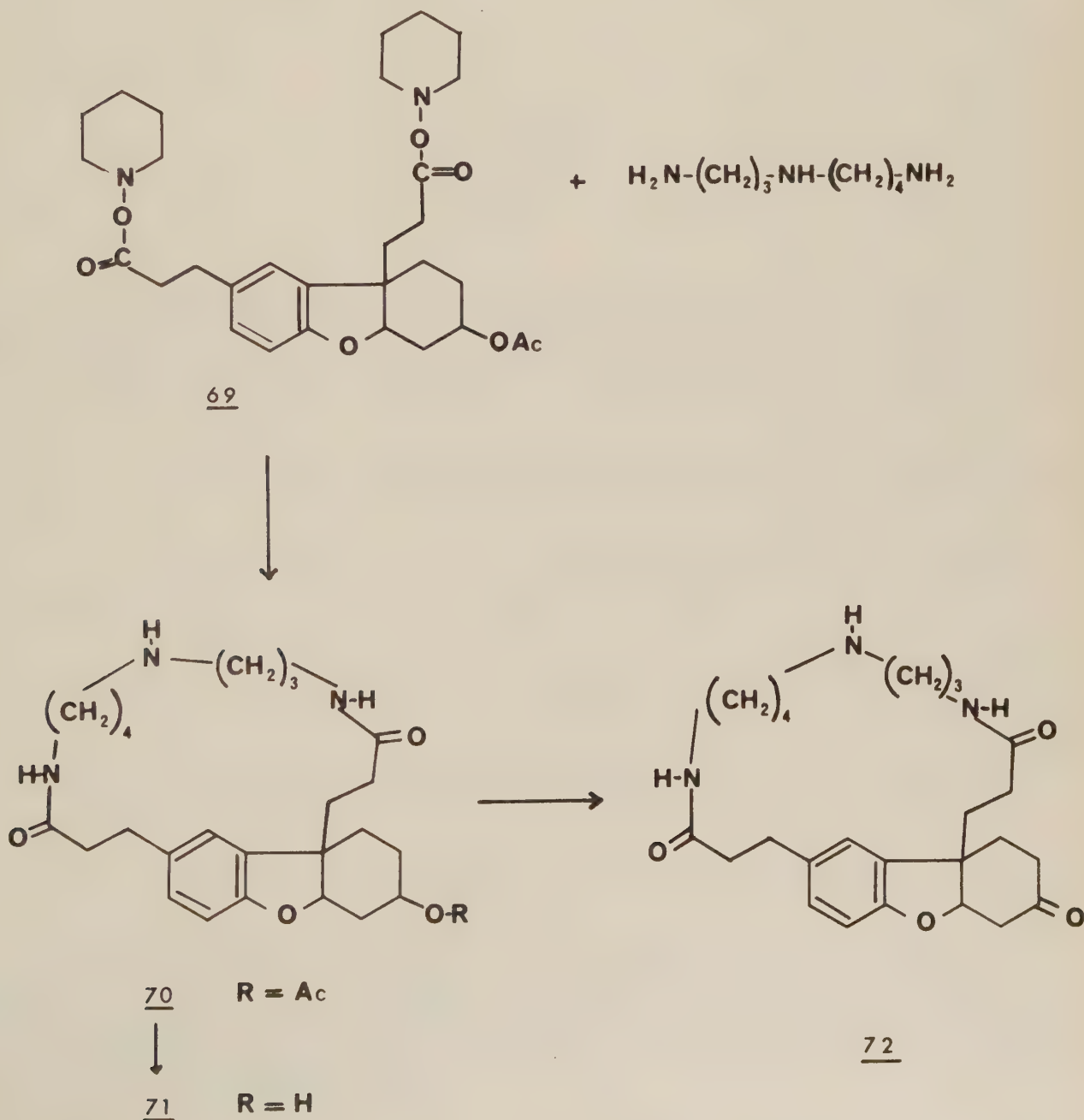
Les esters de N,N-dialcoylhydroxylamines tels que les esters d'hydroxy-1 pipéridine sont relativement inactifs mais sont fortement activés par protonation. Cette protonation peut être le fait de l'addition d'acide au milieu réactionnel ou, simplement, du transfert d'un proton dans le complexe provenant de la condensation de l'amine sur l'ester (⁹³), qui est stabilisé par formation d'une liaison hydrogène ($a \rightarrow b$).



Cette réaction peut être sélective : par exemple, la *n*-butylamine est complètement benzoylée par la benzoyloxy-1 pipéridine alors que, dans les mêmes conditions, la *t*-butylamine ou l'isopropylamine sont peu réactives en raison de l'encombrement stérique qui empêche l'approche de l'amine et la formation d'une liaison hydrogène.

Ces données nous ont amenés à penser que le diester "actif", 69, pourrait être attaqué préférentiellement par les amines primaires de la spermidine situées en bout de chaîne.

En effet, la condensation de la spermidine avec le diester 69, en solution dans le tétrahydrofur anhydre, à reflux, à la concentration de 1%, conduit au dérivé 70, qui, après saponification douce, fournit l'alcool 71, oxydé en tétrahydrolunaridine, 72.



Il est à noter qu'aucun dérivé de la lunarine, ne différant de ceux de la lunaridine que par le sens de l'engagement de la chaîne spermidine dans les liaisons peptidiques, n'a été mis en évidence parmi les produits de la réaction.

==
 ==
 ==
 ==

CONCLUSION

Au cours de ce travail, l'étude des propriétés chimiques et spectrales de la lunarine, alcaloïde majoritaire de Lunaria biennis Moench (Crucifères), a été complétée; elle a permis de démontrer la structure de deux alcaloïdes précédemment extraits de la même plante : la lunaridine et la numismine, et de trois nouveaux alcaloïdes isolés au cours de ce travail : LBX, LBY et LBZ :

- La lunaridine est un isomère de la lunarine, n'en différant que par le sens de l'engagement de la chaîne spermidine dans les liaisons peptidiques.
- La numismine est un composé phénolique, dont le produit d'hydrogénation catalytique est identique à l'hexahydrolunarine.
- L'alcaloïde LBX est analogue à une lunarine dont l'un des protons amidiques et l'amine secondaire sont engagés dans un cycle perhydropyrimidine.
- L'alcaloïde LBY s'est révélé identique au lunarinol II, produit minoritaire obtenu lors de la réduction de la fonction cétonique de la lunarine par le borohydrure de sodium.
- Enfin, l'alcaloïde LBZ est l'alcool 4- α correspondant à LBX.

L'étude biogénétique de la lunarine a été abordée : l'hypothèse d'un couplage oxydatif donnant naissance, dans la plante, à la partie non azotée de la lunarine, a été confirmée par des essais d'incorporation de phénylalanine marquée au ^{14}C . L'emploi de précurseur doublement marqué au ^{14}C et au tritium a permis, d'autre part, d'observer l'existence d'une migration intramoléculaire du tritium au cours de l'hydroxylation qui doit précéder le couplage ("NIH shift").

La synthèse de la tétrahydrolunaridine, dérivé tétrahydrogéné d'un alcaloïde de la lunaire, a été réalisée en deux temps :

- Elaboration du système hexahydrodibenzofuranne substitué par couplage oxydatif de l'ester de l'acide p-hydroxypropionique par voie chimique ou enzymatique ;

- Condensation de la spermidine elle-même avec un diester "actif" du produit de couplage oxydatif.

```

=====
=====
=====
=====
=====

```

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion ont été pris en tube capillaire ou sur bloc Kofler et sont corrigés. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés au moyen, soit du Quick polarimètre Jouan-Roussel, soit du polarimètre Perkin-Elmer, type 141 MC, pour la raie D du sodium.

Les spectres infra-rouge (IR) ont été enregistrés sur appareil Infracord Perkin-Elmer ou sur spectromètre Perkin-Elmer type 257 ; les spectres ultra-violet (UV) sur appareil Bausch et Lomb type "Spectronic 505" ou sur appareil Unicam SP 700 ; les courbes de dichroïsme circulaire sur le dichrographe I Roussel-Jouan.

Les spectres de masse ont été exécutés sur spectrographe AEI, type MS 9. Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN), sauf mention spéciale, ont été réalisés en solution dans le deutérochloroforme sur appareil Varian A 60 A avec le tétraméthylsilane comme indicateur interne ($\delta = 0$). Les singulet, doublet, triplet, quadruplet et multiplet sont respectivement désignés par les lettres s, d, t, q et m.

Sauf indication particulière, les chromatographies sur colonne ont été exécutées sur alumine Merck Activité II-III, les chromatographies sur couche mince (CCM) sur Kieselgel G selon Stahl et les chromatographies sur plaques préparatives sur Kieselgel HF 254 + 366. Les chromatographies en phase gazeuse ont été réalisées sur appareil Perkin-Elmer F 11.

I - ETUDE CHIMIQUE DE LA LUNARINE

Lunarine, 1

Son extraction sera indiquée ci-dessous avec celle des alcaloïdes secondaires. $F = 238-240^{\circ}\text{C}$ (éthanol à 95°C), $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_3, \text{H}_2\text{O}$; $M^+ = 437$; $[\alpha]_D = + 344^{\circ}$ (éthanol à 95°C , $c = 0,176$).

Spectre IR (nujol) : $3400-3430\text{cm}^{-1}$ (OH) ; 3290cm^{-1} (NH) ; 1725cm^{-1} (cétone) ; 1660 et 1540cm^{-1} (amides) ; 1615 et 970cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol, $c = 4,3 \times 10^{-3}$ g/l) : $\lambda_{\max}$. m μ (log. ϵ) :

milieu neutre : 226 (4,41) ; 296 (4,35) ; 317 (4,25) ;

milieu acide : 225 (4,5) ; 300 (4,5) ; 317 (4,34) ;

milieu alcalin : 312 (4,04) ; 368 (4,5).

Dichroïsme circulaire (EtOH ; $c = 1,128$ g/l) : $\lambda_{\max}$. m μ ($\Delta \epsilon$) 240,5 (+ 10,29) ;
286 (+ 10,29) ; 310 (+ 5,03).

Spectre de RMN : Ce spectre a été enregistré sur appareil Varian XL 100-12 (solution dans le deutérochloroforme)

<u>t</u>	5,08ppm		1H	H en 2
<u>d</u>	6,03ppm	{	1H	H en 15
<u>d</u>	7,52ppm		1H	H en 14
<u>d</u>	6,2 ppm		1H	H en 28
<u>d</u>	7,07ppm	{	1H	H en 29
<u>s</u>	7,22ppm		1H	H en 9
<u>d</u>	7,14ppm	{	1H	H en 11
<u>d</u>	6,73 ppm		1H	H en 12
<u>m</u>	6,40ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	8,96ppm		1H	H en 17

Préparation de l'amide témoin : N-méthyl p-méthoxycinnamamide

1) - Obtention de l'acide p-méthoxycinnamique ⁽³⁰⁾ -

Une solution contenant 1g d'aldéhyde anisique, 1,1g d'acide malonique, quelques gouttes de pipéridine dans 40ml de pyridine, est chauffée une heure à 80°C, 2 heures à 100°C et portée à reflux pendant une demi-heure.

Après refroidissement, le mélange réactionnel est jeté dans une solution salée acidifiée par de l'acide chlorhydrique dilué à 10% : l'acide p-méthoxycinnamique précipite. Il est essoré et recristallisé dans le méthanol.

$F = 172^\circ\text{C}$ (bloc Kofler)

Spectre IR (nujol) : 1685cm^{-1} (-C-) ; 1620 et 975cm^{-1} (insaturation éthylénique).



Spectre de RMN (enregistré dans le DMSO) :

<u>d</u>	7,55ppm	{	1H	protons éthyléniques
<u>d</u>	6,31ppm		1H	
<u>d</u>	6,94ppm	{	2H	protons benzéniques
<u>d</u>	7,6 ppm		2H	
<u>s</u>	3,75ppm		3H	-O-CH ₃

2) - Préparation du chlorure d'acide (31) -

500mg de l'acide précédent sont additionnés de 0,3ml de chlorure de thionyle et chauffés à 70-80°C jusqu'à cessation de dégagement gazeux (environ une heure).

L'excès de réactif est évaporé sous pression réduite et le résidu est aussitôt mis en réaction pour l'étape suivante.

3) - Préparation de l'amide, 2 -

Le chlorure d'acide précédent est additionné de quelques gouttes de méthylamine à la température du bain de glace. Après quelques minutes, la coloration jaune du chlorure d'acide disparaît : un contrôle par chromatographie sur couche mince permet de voir que la réaction est complète.

Le mélange réactionnel est largement dilué par de l'eau distillée et extrait par le chloroforme. La phase chloroformique est lavée jusqu'à neutralité, séchée et évaporée sous pression réduite. Elle laisse un résidu solide blanc qui cristallise du méthanol.

On obtient 431mg d'amide 2 ; F = 130°C (bloc Kofler)

Spectre IR (nujol) : 3270cm⁻¹ (NH) ; 1660 et 1570cm⁻¹ (amide) ; 1620-1630 et 980cm⁻¹ (insaturation éthylénique).

Spectre de RMN :

<u>d</u> épaissi	7,16ppm	J = 2cps	1H	H en 10
qui disparaît par deutériation)				
<u>d</u>	6,48ppm	{ J = 16cps	1H	H en 8
<u>d</u>	7,59ppm		1H	H en 7
<u>s</u>	3,75ppm		3H	H en 12
<u>d</u>	2,91ppm	J = 2,5cps	3H	H en 11
<u>d</u>	6,76ppm	{ J = 9cps	2H	H en 2 et 6
<u>d</u>	7,38ppm		2H	H en 3 et 5

Lunarinol I, 3

2g de lunarine sont dissous dans 150ml de méthanol. A cette solution, on ajoute progressivement (en une heure environ) 2g de borohydrure de sodium.

Contact et agitation sont maintenus à température ordinaire pendant 24 heures. La solution est alors largement diluée, acidifiée par de l'acide chlorhydrique, puis alcalinisée par de l'ammoniaque avant d'être extraite par du chloroforme.

Les alcools sont séparés par chromatographie sur colonne d'alumine de leur solution dans le chloroforme. L'élution par le mélange CHCl₃/EtOH 99/1 → 1,28g de lunarinol I, cristallisé dans le mélange méthanol/éther.

F = 255-256°C (bloc Kofler) ;
 $[\alpha]_D^{25} = + 153^\circ$ (EtOH à 95°C ; c = 0,61)
 C₂₅H₃₃O₄N₃ ; M⁺ = 439

Spectre IR (nujol) : 3440cm^{-1} (OH) ; 3290cm^{-1} (NH) ; 1660 et $1540\text{-}1560\text{cm}^{-1}$ (amides) ; $1600\text{-}1620$ et 970cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (EtOH à 95°C ; $c = 8,45 \times 10^{-2}\text{g/l}$) : λ_{max} m μ (log ϵ)

milieu neutre : 220 (4,34) ; 298 (4,26) ; 319 (4,23) ;

milieu acide : 220 (4,54) ; 230 (4,54) ; 300 (4,51) ; 320 (4,49) ;

milieu alcalin : 297 (4,30) ; 317 (4,27).

Dichroïsme circulaire (EtOH ; $c = 0,207\text{g/l}$) : λ_{max} m μ ($\Delta \epsilon$) : 215 (– 15,26) ; 247 (+ 11,02) ; 290 (+ 7,20).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,07ppm (inexistant pour le lunarinol I deutérié)	1H	H en 4
<u>m</u>	4,52ppm	1H	H en 2
<u>d</u>	6 ppm	1H	H en 15
<u>d</u>	7,49ppm { J = 15,5cps	1H	H en 14
<u>d</u>	6,21ppm { J = 16cps	1H	H en 28
<u>d</u>	6,90ppm {	1H	H en 29
<u>d</u>	6,75ppm { J = 8,5cps	1H	H en 12
<u>d</u>	7,19ppm {	1H	H en 11
<u>s</u>	7,15ppm	1H	H en 9
<u>m</u>	6,5 ppm	1H	H en 26
<u>m</u>	8,90ppm	1H	H en 17

Lunarinol II, 4

Séparé du lunarinol I par chromatographie sur colonne d'alumine, il est élué par un mélange $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 95/5.

A partir de 2g de lunarine, on obtient 190mg de lunarinol II recristallisé du mélange méthanol/éther.

F = $270\text{-}272^{\circ}\text{C}$ avec décomposition (tube) ; $[\alpha]_{\text{D}} = + 152^{\circ}$ (EtOH à 95°C ; $c = 0,038$)
 $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M^+ = 439$

Analyse : calc. % C 63,1 H 7,8 N 8,8
 tr. % 63,0 7,5 8,8

Spectre IR (nujol) : $3430\text{-}3440\text{cm}^{-1}$ (OH) ; $3270\text{-}3290\text{cm}^{-1}$ (NH) ; 1660 et 1550cm^{-1} (amides) ; 1640 et 970cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (EtOH ; $c = 10 \times 10^{-3}$ g/l) : $\lambda_{\max}$ m μ (log ϵ)

milieu neutre : 226 (4,4) ; 298 (4,33) ; 320 (4,29) ;
milieu acide : 226 (4,4) ; 302 (4,29) ; 320 (4,26) ;
milieu alcalin : 295 (4,09) ; 315 (4,15).

Dichroïsme circulaire (EtOH, $c = 0,154$ g/l) : $\lambda_{\max}$ m μ ($\Delta \epsilon$) 216 (- 10,83) ;
 247 (+ 10,83) ; 293 (+ 5,13).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	3,93ppm	1H	H en 4
<u>m</u>	4,60ppm	1H	H en 2
<u>d</u>	6,03ppm	1H	H en 15
<u>d</u>	7,5 ppm	1H	H en 14
<u>d</u>	6,24ppm	1H	H en 28
<u>d</u>	6,93ppm	1H	H en 29
<u>d</u>	6,72ppm	1H	H en 12
<u>d</u>	7,09ppm	1H	H en 11
<u>s</u>	7,16ppm	1H	H en 9
<u>m</u>	6,5 à 6,75ppm	1H	H en 26
<u>m</u>	8,9 ppm	1H	H en 17

Alcools de "Pummerer", 9 et 10

La cétone de Pummerer, 18 (cét-4 diméthyl-7,10 tétrahydro-2,3,4,7 dibenzofuranne), obtenue par oxydation du p-crésol par le ferricyanure de potassium, selon la technique décrite par C.G. HAYNES et coll. (57), séparée sur plaques épaisses de gel de silice (solvant de migration = benzène/acétate d'éthyle 6/1) et purifiée par sublimation à 100°C ou cristallisation dans le méthanol, a été hydrogénée catalytiquement dans l'éthanol en présence de charbon palladié à 10%.

La cétone de Pummerer hydrogénée (cét-4 diméthyl-7,10 hexahydro-2,3,4,5,6,7 dibenzofuranne) est également séparée sur plaques préparatives de gel de silice (solvant de migration = benzène/acétate d'éthyle 90/10) et purifiée par sublimation à 100°C.

200mg de cette "cétone" hydrogénée sont mis en solution dans le méthanol. 200mg de borohydrure de sodium sont ajoutés progressivement à cette solution.

Le contact est maintenu une nuit. Après dilution du mélange réactionnel par de l'eau salée, on extrait par le chloroforme. L'évaporation du solvant laisse 170mg de résidu.

La séparation des alcools épimères est très difficile : après chromatographies successives sur plaques préparatives et analytiques de gel de silice (solvant de migration = benzène/acétate d'éthyle 80/20), on obtient finalement :

81mg de l'épimère 10 pur ;
 6mg de l'épimère 9 très purifié.

Les composés 12 et 11 sont obtenus à partir des alcools précédents par acétylation par l'anhydride acétique dans la pyridine.

* Séparation de l'isolunarine et des isolunarinols

La séparation des produits d'isomérisation est obtenue par chromatographie sur plaques de gel de silice.

Le solvant de migration est un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 88/12, saturé d'ammoniac pour l'isolunarine, un mélange $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 90/10, saturé d'ammoniac, pour les isolunarinols.

L'isolunarine est éluée par un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 80/20 saturé d'ammoniac, les isolunarinols par un mélange de $\text{CHCl}_3/\text{éthanol}$ 75/25 saturé d'ammoniaque.

Isolunarine

Plus polaire que la lunarine, elle n'a pas été obtenue cristallisée.

$[\alpha]_D = + 195^\circ$ (éthanol, $c = 0,45$) ; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_3$; $M^+ = 437$.

Spectre IR (nujol) : $3260\text{-}3280\text{cm}^{-1}$ (NH) ; 1720cm^{-1} (cétone) ; 1660 et 1540cm^{-1} (amides) ; $1620\text{-}1630$ et 980cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol ; $c = 12 \times 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 216 (4,23) ; 226 (4,22) ; 297 (4,05) ; 315 (3,96) ;
milieu acide : 219 (4,14) ; 229 (4,14) ; 298 (4,03) ;
milieu alcalin : 299 (3,92) ; 313 (3,92) ; 365 (3,90).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	5,03ppm	1H	H en 2
<u>d</u>	5,85ppm	1H	H en 15
<u>d</u>	6,76ppm	{ J = 12,5cps	H en 14
<u>d</u>	6,31ppm		H en 28
<u>d</u>	7,05ppm	{ J = 15,5cps	H en 29
<u>d</u>	6,76ppm		H en 12
<u>d</u> dédoublé	7,16ppm	{ $J_{\text{H}11\text{-H}12} = 8,5\text{cps}$ $J_{\text{H}9\text{-H}11} = 2\text{cps}$	H en 11
<u>d</u>	7,8ppm		H en 9
<u>m</u>	5,9 à 6,3ppm	1H	H en 26
<u>m</u>	7,98ppm	1H	H en 17

Isolunarinol I

Plus polaire que le lunarinol I, c'est un produit amorphe.
 $[\alpha]_D = + 89^\circ$ (éthanol ; $c = 0,38$) ; $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_3$; $M^+ = 439$.

Spectre IR (nujol) : 3380cm^{-1} (OH) ; $3275\text{-}3285\text{cm}^{-1}$ (NH) ; 1665 et $1540\text{-}1560\text{cm}^{-1}$ (amides) ; $1610\text{-}1630$ et 980cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol ; $c = 13,5 \times 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 216 (4,39) ; 297 (4,08) ; 315 (4,04) ;
milieu acide : 217 (4,37) ; 229 (4,31) épaulement ; 297 (4,11) ; 312 (4,08) ;
milieu alcalin : 292 (4,08) ; 312 (4,03).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	3,93ppm	1H	H en 4	
<u>m</u>	4,55ppm	1H	H en 2	
<u>d</u>	5,85ppm	J = 13cps	1H	H en 15
<u>d</u>	6,76ppm			
<u>d</u>	6 ppm	J = 15,5cps	1H	H en 28
<u>d</u>	6,94ppm			
<u>d</u>	6,97ppm	J = 8cps	1H	H en 12
<u>d</u> dédoublé	7,13ppm	$\begin{cases} J_{\text{H9-H11}}=2\text{cps} \\ J_{\text{H11-H12}}=8\text{cps} \end{cases}$	1H	H en 11
<u>d</u>	7,6 ppm	J = 2cps	1H	H en 9
<u>m</u>	8,21ppm	1H	H en 17	
<u>m</u>	5,9 à 6,2ppm	1H	H en 26	

Isolunarinol II

Plus polaire que le lunarinol II, il n'a pas été obtenu cristallisé ;

$[\alpha]_{\text{D}} = + 79^{\circ}$ (éthanol à 95° ; $c = 0,072$) ; $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4$; $M^+ = 439$.

Spectre IR (nujol) : 3380cm^{-1} (OH) ; $3260\text{-}3280\text{cm}^{-1}$ (NH) ; 1660 et $1540\text{-}1550\text{cm}^{-1}$ (amides) ; 1620 et 975cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol, $c = 18,9 \cdot 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 213 (4,3) ; 296 (4,06) ; 311 (4,02) ;
milieu acide : 215 (4,3) ; 297 (4,04) ; 313 (4,02) ;
milieu alcalin : 295 (4,10) ; 312 (4,06).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	3,88ppm	1H	H en 4	
<u>m</u>	4,57ppm	1H	H en 2	
<u>d</u>	5,8 ppm	J = 12,5cps	1H	H en 15
<u>d</u>	6,71ppm			
<u>d</u>	6,15ppm	J = 15,5cps	1H	H en 28
<u>d</u>	7 ppm			

<u>d</u>	6,74ppm	J = 8,5cps	1H	H en 12
<u>d</u> dédoublé	7,05ppm	$\left\{ \begin{array}{l} J_{H11-H12}=8,5cps \\ J_{H9-H11}=1,5cps \end{array} \right.$	1H	H en 11
<u>d</u>	7,6 ppm	J=1,5cps	1H	H en 9
<u>m</u>	5,9 à 6,2ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	8,18ppm		1H	H en 17

* Hydrogénation de la lunarine

A une solution de 200mg de lunarine dans l'éthanol, on ajoute 40mg de charbon palladié à 10%.

L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant 24 heures.

Le milieu réactionnel est filtré sur Hyflosupercel : la solution éthanolique est évaporée à sec sous pression réduite ; on obtient 172mg d'un résidu solide légèrement coloré en jaune.

La séparation des produits d'hydrogénation est opérée sur plaque de gel de silice, migrant dans un mélange de $CHCl_3$ /éthanol 90/10 saturé d'ammoniac.

Les différents produits séparés sont élués par un mélange $CHCl_3$ /éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque.

On obtient 67mg d'hexahydrolunarine (le plus polaire des produits d'hydrogénation), 65mg de tétrahydrolunarine et 6mg d'un composé de masse 469, soit 32 unités de masse de plus que la lunarine initiale.

Tétrahydrolunarine, 16

$C_{25}H_{35}O_4N_3$: $M^+ = 441$; $[\alpha]_D = + 187^\circ$ (éthanol ; c = 0,108).

Spectre IR (solution chloroformique) : $3300-3290cm^{-1}$ (NH) ; $1725cm^{-1}$ (cétone) ; $1640-1650cm^{-1}$ et $1540-1560cm^{-1}$ (amides).

Spectre UV (éthanol à 95° ; c = $10,84 \times 10^{-2}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 229 (3,81) ; 287 (3,52) ; 291 (3,48) ;
milieu acide : 229 (3,82) ; 287 (3,51) ; 291 (3,48) ;
milieu alcalin : 287 (3,52) ; 291 (3,49).

Dichroïsme circulaire (éthanol ; c = 0,46 g/l) : λ_{max} m μ ($\Delta \epsilon$) : 233 (+ 4,69) ;
 283 (+ 3,16) ; 307 (+ 0,96).

Spectre de RMN :

<u>t</u>	4,84ppm	1H	H en 2
<u>s</u>	6,94ppm	1H	H en 9
<u>d</u>	6,65ppm	J = 9cps	H en 12
<u>d</u>	6,98ppm		H en 11
<u>m</u>	7,33ppm	1H	H en 17
<u>m</u>	6,8 à 7,1ppm	1H	H en 26

Hexahydrolunarine, 17

Séparée comme il est indiqué ci-dessus, elle peut également être obtenue seule :

120mg de sodium finement coupé sont dissous dans 40ml d'éthanol. Après dissolution, on ajoute 100mg de lunarine et 20mg de charbon palladié à 10%.

L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant 24 heures. Après filtration sur Hyflosupercel, la solution alcoolique est concentrée sous pression réduite. Amenée à pH 5-6 par addition d'acide chlorhydrique dilué à 5%, la solution est re-alcalinisée par de l'ammoniaque et extraite par le chloroforme.

Après évaporation du solvant, il reste 40mg d'un résidu visqueux jaune pâle.

L'hexahydrolunarine répond à la formule brute $C_{25}H_{37}O_4N_3$; $M^+ = 443$;

$[\alpha]_D = 0$ (éthanol à 95°C ; c = 0,141).

Spectre IR (nujol) : 3400cm^{-1} (OH) ; 3270cm^{-1} (NH) ; 1715cm^{-1} (cétone) ; 1645 et 1550cm^{-1} (amides).

Spectre UV (éthanol ; c = 0,045g/l) : λ_{max} mμ (log ε) :

milieu neutre : 229 (3,87) ; 285 (3,47) ;
milieu acide : 229 (3,86) ; 285 (3,46) ;
milieu alcalin : 251 (3,84) ; 305 (3,49) ;

Dichroïsme circulaire (éthanol ; c = 0,091 g/l) : absorption dichroïque ($\Delta \epsilon$) nulle entre 230 et 350mμ.

Spectre de RMN : mal résolu, on observe de fins massifs où l'on peut localiser :

<u>s</u> élargi	6,85ppm	1H	H en 9
<u>d</u>	6,97ppm	J = 8cps	H en 11
<u>d</u>	6,8 ppm		H en 12

* Hydrogénation des lunarinols

300mg de lunarinol I sont mis en solution dans l'éthanol. A cette solution, on ajoute 60mg de charbon palladié à 10%. L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant 24 heures.

Après filtration sur hyflosupercel, la solution éthanolique est évaporée sous pression réduite : on obtient 245mg d'un mélange qui est filtré sur colonne d'alumine désactivée (activité V), dans le chloroforme ; on sépare ainsi 23mg d'un mélange de tétrahydrolunarinol I et de lunarinol I (M + 32) et 216mg de tétrahydrolunarinol I, cristallisé dans un mélange éthanol/acétone (1^{er} jet : 142mg).

Le tétrahydrolunarinol II est obtenu dans les mêmes conditions à partir du lunarinol II.

Tétrahydrolunarinol I, 20a (= 5)

$C_{25}H_{37}O_4N_3$; $M^+ = 443$; $F = 185-188^\circ C$ (tube) ; $[\alpha]_D = + 106^\circ$ (éthanol, $c = 0,45$).

<u>Analyse</u> :	calculé %	C 67,6	H 8,4	N 9,4
	trouvé %	67,3	8,5	9,1

Spectre IR (nujol) : $3430cm^{-1}$ (OH) ; $3270-3310cm^{-1}$ (NH) ; 1640 et $1540-1550cm^{-1}$ (amides).

Spectre UV (éthanol ; $c = 16,7 \times 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

<u>milieu neutre</u> :	231 (3,75) ; 286 (3,39)
<u>milieu acide</u> :	231 (3,79) ; 285 (3,44)
<u>milieu alcalin</u> :	285 (3,53)

Dichroïsme circulaire (éthanol ; $c = 0,160$ g/l) : λ_{max} m μ ($\Delta \epsilon$) :

229 (+ 12,73) ; 282(+ 2,49).

Spectre de RMN :

<u>t</u>	4,45ppm		1H	H en 2
<u>m</u>	3,85ppm		1H	H en 4
<u>s</u>	6,9 ppm		1H	H en 9
<u>d</u>	7 ppm	} $J = 7,5cps$	1H	H en 11
<u>d</u>	6,7 ppm		1H	H en 12
<u>m</u>	7,1 à 7,3ppm		1H	H en 17
<u>m</u>	6,7 à 7ppm		1H	H en 26

Tétrahydrolunarinol II, 20b (= 6)

$C_{25}H_{37}O_4N_3$; $M^+ = 443$; $[\alpha]_D = + 71^\circ$ (éthanol ; $c = 0,48$)

Spectre IR (solution chloroformique) : $3300cm^{-1}$ (NH) ; 1660 et $1515-1525cm^{-1}$ (amides).

Spectre UV (éthanol ; $c = 17,9 \times 10^{-3}$ g/l) : $\lambda_{\max}$ m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 231 (3,77) ; 287 (3,41)

milieu acide : 231 (3,78) ; 285 (3,47)

milieu alcalin : 285 (3,62)

Dichroïsme circulaire (éthanol ; $c = 0,188$ g/l) : $\lambda_{\max}$ m μ ($\Delta \epsilon$) :
288 (+ 2,60) ; 286 (+ 2,36).

Spectre de RMN :

<u>t</u>	4,5 ppm	1H	H en 2
<u>m</u>	3,95ppm	1H	H en 4
<u>d</u>	6,66ppm	} J=8cps	H en 12
<u>d</u>	6,97ppm		H en 11
<u>s</u>	6,9 ppm	1H	H en 9
<u>m</u>	7,1 à 7,3ppm	1H	H en 17
<u>m</u>	6,8 à 7,1ppm	1H	H en 26

Produits secondaires d'hydrogénation de la lunarine et des lunarinols

	(M+32) Lunarine	(M+32) Lunarinol I	(M+32) Lunarinol II
IR (solution dans CHCl_3)	3200-3300 cm^{-1} (NH); 1710 cm^{-1} (cétone) ; 1650, 1540 cm^{-1} (amides); disparition bandes d'insaturation éthylénique	3250 cm^{-1} (NH); 1650 et 1540 cm^{-1} (amides) ; disparition bandes d'insaturation éthylénique	3250 cm^{-1} (NH) ; 1650 et 1530 cm^{-1} (amides) ; disparition bandes d'insaturation éthylénique
Masse	$M^+ = 469$ avec pics à M-15 et M-29	$M^+ = 471$ avec pics à M-15 et M-29	$M^+ = 471$ avec pics à M-15 et M-29
RMN	<u>m</u> 4,91ppm H-2 <u>d</u> 6,95ppm H-11 <u>d</u> 6,58ppm } J=8 H-12 <u>s</u> 7,10ppm H-9 <u>t</u> 1,35ppm <u>CH₂-CH₂</u> -	<u>m</u> 4,45ppm H-2 6,97ppm <u>dd</u> { $J_{\text{H}9-\text{H}11}=2$ H-11 $J_{\text{H}11-\text{H}12}=8,5$ <u>d</u> 6,68ppm J=8,5 H-12 <u>d</u> 6,97ppm J=2 H-9 <u>t</u> 1,08ppm <u>CH₃-CH₂</u> <u>m</u> 3,75ppm <u>CH₃-CH₂</u> H-4	<u>m</u> 4,5 ppm H-2 <u>d</u> 6,92ppm H-11 <u>d</u> 6,63ppm } J=8,5 H-12 <u>s</u> élargi 6,88ppm H-9 <u>t</u> 0,97ppm <u>CH₂-CH₂</u> - <u>m</u> 3,95ppm <u>CH₃-CH₂</u> H-4

J en cps ; dd = doublet dédoublé.

* Acétylation de la lunarine et des lunarinols

N-acétyllunarine, 21

106mg de lunarine sont additionnés de 15ml de pyridine et 15ml d'anhydride acétique. Le contact est maintenu à température ordinaire, sous agitation magnétique, pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est jeté dans un mélange eau + glace + lessive de soude avant d'être extrait par le chloroforme tiède.

L'évaporation du solvant laisse un résidu de 112mg.

$C_{27}H_{33}O_5N_3$; $M^+ = 479$; $[\alpha]_D = + 219^\circ$ (éthanol à 95° ; $c = 0,101$).

Spectre IR (nujol) : $3270-3290cm^{-1}$ (NH) ; $1725-1730cm^{-1}$ (cétone) ; 1665 et $1545-1555cm^{-1}$ (amides) ; $1620-1635$ et $980cm^{-1}$ (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol à 95° ; $c = 10,1 \times 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 223 (4,32) ; 297 (4,22) ; 318 (4,13) ;
milieu acide : 223 (4,36) ; 297 (4,22) ; 318 (4,13) ;
milieu alcalin : 312 (3,90) ; 369 (4,30)

Spectre de RMN :

<u>s</u>	2,03ppm		3H	<u>CH₃-CO-N</u>
<u>m</u>	5 ppm		1H	H en 2
<u>d</u>	6,18ppm	J=15cps	1H	H en 15
<u>d</u>	7,5 ppm		1H	H en 14
<u>d</u>	6,21ppm		1H	H en 28
<u>d</u>	6,83ppm	J=15,5cps	1H	H en 29
<u>s</u>	7,25ppm		1H	H en 9
<u>d</u>	7,2 ppm	J=8cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,76ppm		1H	H en 12
<u>m</u>	7,65ppm		1H	H en 17
<u>m</u>	6,1 à 6,6ppm		1H	H en 26

N-acétyllunarinol I et N-acétylisolunarinol I

400mg de lunarinol I sont mis en solution dans 60ml de méthanol. A cette solution, on ajoute 8ml d'anhydride acétique.

Le contact est maintenu à température ordinaire pendant 24 heures. Le milieu réactionnel est versé dans un mélange eau + glace + lessive de soude. La phase méthanol-aqueuse est concentrée avant d'être extraite par le chloroforme ; après évaporation du solvant, on obtient 222mg d'un mélange de deux produits.

La chromatographie sur colonne d'alumine n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, ces produits ont été séparés sur plaques préparatives de gel de silice dans les conditions suivantes : solvant de migration = chloroforme/méthanol 90/10 saturé d'ammoniac ; nombre de migrations : 2 ; éluant : chloroforme/méthanol 70/30.

A partir de 100mg du mélange, on sépare 24mg de N-acétylisolunarinol I et 71mg de N-acétyllunarinol I.

• N-acétyllunarinol I, 22

Il répond à la formule brute $C_{27}H_{35}O_5N_3$; $M^+ = 481$;

$$[\alpha]_D = + 67^\circ \text{ (éthanol à } 95^\circ \text{ ; } c = 0,12)$$

Spectre IR (nujol) : $3390\text{-}3400\text{cm}^{-1}$ (OH); 3280cm^{-1} (NH); 1665 et 1550cm^{-1} (amides) ; $1625\text{-}1630$ et 980cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol à 95° ; $c = 12,54 \times 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 226 (4,27) ; 292 (4,13) ; 298 (4,16) ; 320 (4,12) ;
milieu acide : 225 (4,29) ; 292 (4,13) ; 298 (4,16) ; 320 (4,11) ;
milieu alcalin : 292 (4,14) ; 298 (4,17) ; 320 (4,14).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,06ppm		1H	H en 4
<u>m</u>	4,51ppm		1H	H en 2
<u>s</u>	2,03ppm		3H	<u>CH₃</u> -CO-N
<u>d</u>	6,15ppm	} J=15cps	1H	H en 15
<u>d</u>	7,5 ppm		1H	H en 14
<u>d</u>	6,6 ppm	} J=15,5cps	1H	H en 28
<u>d</u>	6,96ppm		1H	H en 29
<u>d</u>	7,18ppm	} J=8cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,8 ppm		1H	H en 12
<u>s</u> élargi	7,28ppm		1H	H en 9
<u>m</u>	6,1 à 6,6ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	7,2 à 7,5ppm		1H	H en 17

• N-acétylisolunarinol I, 23

Produit minoritaire formé au cours de l'acétylation du lunarinol I, il résulte de l'isomérisation du lunarinol de départ ou de celle du produit déjà acétylé.



Spectre IR (solution chloroformique) : 3310cm^{-1} (NH) ; $1645\text{-}1670$ et $1540\text{-}1560\text{cm}^{-1}$ (amides) ; 1640 et 980cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol à 95°C ; c = 8,82 x 10⁻³ g/l) : $\lambda_{\max}$ m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 297 (4) ; 313 (3,94) ;
milieu acide : 296 (4) ; 313 (3,94) ;
milieu alcalin : 296 (4,02) ; 311 (3,97).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,46ppm		1H	H en 2
<u>m</u>	3,86ppm		1H	H en 4
<u>d</u>	5,75ppm	} J=12,5cps	1H	H en 15
<u>d</u>	6,9 ppm		1H	H en 14
<u>d</u>	6,60ppm		1H	H en 12
		J _{H11-H12} =8cps		
<u>d</u> dédoublé	7,05ppm	} J _{H11-H12} =8cps J _{H11-H9} =2cps	1H	H en 11
<u>d</u>	7,65ppm	J _{H11-H9} =2cps	1H	H en 9
<u>d</u>	6,05ppm	} J=15cps	1H	H en 28
<u>d</u>	6,88ppm		1H	H en 29
<u>m</u>	6,4 à 6,7ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	6,7 à 7,4ppm		1H	H en 17
<u>s</u>	2,03ppm		3H	<u>CH₃</u> -CO-N

N-acétyltétrahydrolunarinol I, 24a

50mg de tétrahydrolunarinol I sont dissous dans 10ml de méthanol. On ajoute 1ml d'anhydride acétique.

Le contact est maintenu, sous agitation magnétique, à température ordinaire, pendant 24 heures.

L'extraction est faite comme pour le N-acétyllunarinol I. On obtient 39mg d'un résidu solide blanc.

Le N-acétyltétrahydrolunarinol I est purifié par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice (solvant de migration : chloroforme/éthanol 90/10 saturé en ammoniac ; nombre de migration : 1 ; éluant : chloroforme/éthanol 50/50 saturé en ammoniac). On recueille 29mg de produit pur à la chromatographie sur couche mince.

Produit amorphe répondant à la formule brute C₂₇H₃₉O₅N₃ ; M⁺ = 485 ;

$[\alpha]_D = + 107^\circ$ (éthanol ; c = 0,55).

Spectre IR (solution chloroformique) : 3365cm⁻¹ (NH) ; 1635-1660 et 1535cm⁻¹ (amides).

Spectre UV (éthanol ; c = 0,024 g/l) : $\lambda_{\max}$ m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 232 (3,87) ; 287 (3,43) ;
milieu acide : 232 (3,86) ; 287 (3,42) ;
milieu alcalin : 286 (3,31).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,45ppm		1H	H en 2
<u>m</u>	3,66ppm		1H	H en 4
<u>d</u>	6,65ppm	} J=8cps	1H	H en 12
<u>d</u>	6,9 ppm		1H	H en 11
<u>s</u>	6,98ppm			H en 9
<u>m</u>	6,22ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	6,75 à 7ppm		1H	H en 17
<u>s</u>	2,02ppm		3H	<u>CH₃</u> -CO-N

N-acétyltétrahydrolunarinol II, 24b

Il est préparé et purifié dans les mêmes conditions que le dérivé précédent : à partir de 45mg de tétrahydrolunarinol II, on obtient 25mg de produit brut et 17mg de produit pur.



Spectre IR (solution chloroformique) : 3340cm^{-1} (NH) ; $1640\text{-}1660$ et 1535cm^{-1} (amides).

Spectre UV (éthanol ; $c = 0,036$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 231 (3,85) ; 286 (3,50) ;
milieu acide : 231 (3,84) ; 286 (3,50) ;
milieu alcalin : 286 (3,48).

Spectre de RMN :

<u>s</u>	2,04ppm		3H	<u>CH₃</u> -CO-N
<u>m</u>	4,01ppm		1H	H en 4
<u>m</u>	4,57ppm		1H	H en 2
<u>m</u>	6,18ppm		1H	H en 26
<u>d</u>	6,93ppm	} J=8cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,65ppm		1H	H en 12
<u>s</u>	7 ppm		1H	H en 9
<u>m</u>	6,7 à 7ppm		1H	H en 17

N,O-diacétyltétrahydrolunarinol I, 25 (= 7)

A 20mg de tétrahydrolunarinol I, on ajoute 3ml de pyridine et 3ml d'anhydride acétique. On maintient le contact, à température ordinaire et sous agitation magnétique, pendant 24 heures.

L'extraction est faite comme pour les composés précédents : on obtient 21mg d'un produit qui est purifié sur plaque préparative de gel de silice (solvant de migration : chloroforme/éthanol 90/10 saturé d'ammoniac ; nombre de migration : 1 ; éluant : chloroforme/éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque).

$C_{29}H_{41}O_6N_3$; $M^+ = 527$; $[\alpha]_D = + 110^\circ$ (éthanol à 95° ; $c = 0,386$).

Spectre IR (solution chloroformique) : $3345cm^{-1}$ (NH) ; $1735cm^{-1}$ (ester) ; $1630-1655$ et $1530cm^{-1}$ (amides).

Spectre UV (éthanol ; $c = 0,043$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 231 (3,86) ; 286 (3,51) ;
milieu acide : 231 (3,86) ; 286 (3,50) ;
milieu alcalin : 286 (3,45).

Spectre de RMN :

<u>s</u>	1,96ppm	3H	CH ₃ -CO-O
<u>s</u>	2,03ppm	3H	CH ₃ -CO-N
<u>m</u>	4,51ppm	1H	H en 2
<u>m</u>	4,75ppm	1H	H en 4
<u>m</u>	6,25ppm	1H	H en 26
<u>d</u>	6,7 ppm	1H	H en 12
<u>d</u>	6,97ppm	1H	H en 11
<u>s</u> mal résolu	7,01ppm	1H	H en 9
<u>m</u>	6,5 à 6,8ppm	1H	H en 17

$J=8cps$

* Méthylation des lunarinols

N-méthyltétrahydrolunarinol I, 26

A 100mg de tétrahydrolunarinol I, on ajoute 2,5ml d'une solution aqueuse de formol à 40% et quelques gouttes d'acide acétique pour solubiliser. En opérant à la température du bain de glace, on ajoute progressivement 100mg de borohydrure de sodium. On maintient contact et agitation pendant 2 heures. Après dilution par de l'eau distillée et alcalinisation par de la soude, on extrait par le chloroforme.

Après évaporation du solvant, on obtient 79mg de produit brut. Ce produit est chromatographié sur colonne d'alumine (alumine activité IV). L'élution par le chloroforme permet de séparer 33mg d'un produit purifié.

Une nouvelle purification est faite par chromatographie sur plaque préparative (solvant de migration : chloroforme/éthanol 90/10 saturé d'ammoniac ; nombre de migration : 1 ; éluant : chloroforme/éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque. On isole 27mg du N-méthyltétrahydrolunarinol I.

$C_{26}H_{39}N_3O_4$; $M^+ = 457$; $[\alpha]_D = + 128^\circ$ (éthanol à 95° ; $c = 0,106$).

Spectre IR (nujol) : $3410-3420cm^{-1}$ (OH) ; $3260-3280cm^{-1}$ (NH) ; $1640-1650$ et $1545-1555cm^{-1}$ (amides).

Spectre UV (éthanol à 95°C ; c = $2,66 \times 10^{-2}$ g/l) : $\lambda_{\max}$ mμ (log ε) :

milieu neutre : 231 (3,83) ; 286 (3,49) ; 292 (3,43) ;
milieu acide : 231 (3,83) ; 286 (3,50) ; 292 (3,43) ;
milieu alcalin : 286 (3,53) ; 292 (3,50) .

Spectre de RMN :

<u>s</u>	2,15ppm		3H	CH ₃ -N
<u>m</u>	4,45ppm		1H	H en 2
<u>s</u>	6,93ppm		1H	H en 9
<u>d</u>	7 ppm	} J=8,5cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,7 ppm		1H	H en 12
<u>m</u>	6,5 à 6,8ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	6,9 à 7,2ppm		1H	H en 17
<u>m</u>	3,81ppm		1H	H en 4

Produit de cyclisation du tétrahydrolunarinol I, 27 ou 28

Formé en même temps que le composé précédent au cours de la méthylation par l'aldéhyde formique en milieu acétique et en présence de borohydrure de sodium, on l'obtient également par action du seul formol en milieu acétique.

A 39mg de tétrahydrolunarinol I, on ajoute 2ml d'une solution aqueuse de formol à 40% et quelques gouttes d'acide acétique. Après contact de 2 heures, sous agitation magnétique, le milieu réactionnel est alcalinisé par de la lessive de soude, largement dilué par de l'eau distillée et extrait par le chloroforme.

L'évaporation du solvant laisse un résidu de 29mg dans lequel le composé attendu est largement majoritaire.

Il est purifié par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice (solvant de migration : chloroforme/éthanol 93/7 saturé d'ammoniac ; nombre de migration : 1 ; éluant : chloroforme/éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque).

On sépare 20mg de produit purifié. Moins polaire que le N-méthyltétrahydrolunarinol I, c'est un produit amorphe.

$C_{26}H_{37}O_4N_3$; $M^+ = 455$; $[\alpha]_D = + 148^\circ$ (éthanol à 95°C ; c = 0,112).

Spectre IR (nujol) : 3400cm^{-1} (OH) ; 3290cm^{-1} (NH) ; $1635\text{-}1650$ et 1550cm^{-1} (amides).

Spectre UV (éthanol à 95°C ; c = $11,2 \times 10^{-2}$ g/l) : $\lambda_{\max}$ mμ (log ε) :

milieu neutre : 231 (3,8) ; 287 (3,42) ; épaulement à 291 (3,38) ;
milieu acide : 231 (3,79) ; 286 (3,41) ; épaulement à 290 (3,37) ;
milieu alcalin : épaulement à 229 (3,85) ; 287 (3,43) ; épaulement à 290 (3,39).

Spectre de RMN :

<u>s</u>	6,86ppm		1H	H en 9
<u>d</u>	6,96ppm	} J = 8,5cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,69ppm		1H	H en 12
<u>m</u>	4,46ppm		1H	H en 2
<u>m</u>	6,8 à 7,2ppm			H en 26 ou 17
<u>m</u>	3,7 à 4,1ppm		2H	H en 32

L'acétylation de ce composé par l'anhydride acétique dans la pyridine conduit au dérivé O-acétylé de masse $M^+ = 497$.

II - EXTRACTION DES ALCALOÏDES DE LA LUNAIRE

L'extraction des alcaloïdes totaux a été faite selon la technique décrite par P. POTIER ⁽¹⁷⁾, légèrement modifiée :

16kg de poudre de graines ont été utilisés.

Après dégraissage par l'éther de pétrole, la poudre de graines séchée a été épuisée successivement par l'alcool à 95°C contenant 5% d'acide acétique, l'alcool à 95°C contenant 3% d'acide acétique et par l'alcool à 95°C seul jusqu'à ce que le test de Meyer effectué sur le liquide d'épuisement soit négatif.

Le liquide d'épuisement, partiellement concentré, est soumis à un nouveau dégraissage par l'éther de pétrole avant d'être alcalinisé par l'ammoniaque en présence de chlorure de méthylène (4 l.). L'extraction est poursuivie par le chlorure de méthylène, par fractions de 1 l., puis 500ml, puis 200ml (au total 12,4 l.).

Les solutions chlorométhyléniques sont évaporées à sec : 196g d'alcaloïdes totaux sont ainsi obtenus (rendement 1,2%).

Les trois nouveaux alcaloïdes LBX, LBY et LBZ ont été isolés après plusieurs chromatographies sur colonne d'alumine, puis sur plaques épaisses de gel de silice.

Dans un premier temps, ils ont été séparés des alcaloïdes déjà connus et relativement abondants (lunarine, lunaridine, numismine) par chromatographies successives sur colonne d'alumine selon la technique citée par P. POTIER, J. LE MEN et M.-M. JANOT ⁽¹²⁾.

Il est à noter que la lunariamine ⁽¹¹⁾ n'a pas été retrouvée.

La dernière des chromatographies sur colonne a permis de séparer le mélange des alcaloïdes LBX, LBY et LBZ de la lunarine et de la lunaridine, en partant de 22g de mélange.

Elle a été réalisée sur une colonne d'alumine Merck, activité II-III, représentant quarante fois le poids des alcaloïdes.

1/5 du poids d'alumine (soit 176g) a servi à préparer une pâte avec les alcaloïdes solubilisés à chaud dans l'éthanol à 95°C.

Après totale dessiccation, les alcaloïdes ainsi adsorbés sur alumine ont été versés au sommet d'une colonne préparée avec 774g d'alumine dans le chlorure de méthylène.

• Par élution au chlorure de méthylène additionné de 1% d'éthanol, on a obtenu : d'abord 977mg d'un mélange d'alcaloïde LBX et de lunarine, puis 377mg d'un mélange d'alcaloïde LBX, de lunarine et d'alcaloïde LBY.

Dans les deux cas, une partie de la lunarine a été séparée par cristallisation dans l'éthanol.

• Par élution au chlorure de méthylène additionné de 5% d'éthanol, on a obtenu 535mg d'un mélange de lunaridine, d'alcaloïde LBY et d'alcaloïde LBZ.

Séparation des alcaloïdes LBX, LBY et LBZ

• A partir des 977mg élués par le mélange chlorure de méthylène/éthanol 99/1, 259mg de lunarine cristallisée ont été séparés.

La chromatographie sur plaque préparative de gel de silice des eaux-mères de cristallisation a conduit à la séparation de :

95mg de lunarine
175mg d'alcaloïde LBX impur.

• A partir des 377mg élués dans les mêmes conditions, 130mg de lunarine cristallisée ont été obtenus.

Les eaux-mères de cristallisation chromatographiées sur plaque préparative de gel de silice ont fourni :

34mg d'alcaloïde LBY impur ;
54mg de lunarine ;
64mg d'alcaloïde LBX impur.

Les chromatographies sur plaques préparatives de silice ont été réalisées avec : pour solvant de migration, un mélange chloroforme/éthanol 92/8 saturé en ammoniac, et, pour éluant un mélange chloroforme/éthanol 80/20 saturé en ammoniaque.

Les différents échantillons d'alcaloïde LBX ont été purifiés par chromatographies successives sur plaques préparatives dans les conditions indiquées ci-dessus.

Finalement, 87mg d'alcaloïde LBX pur ont été obtenus, recristallisés dans un mélange méthanol/acétone (0,04% des alcaloïdes totaux ; 5×10^{-4} g% de la poudre initiale).

• Les 535mg élués par chlorure de méthylène/éthanol 95/5 ont été chromatographiés sur plaque préparative dans des conditions analogues aux précédentes.

Ils ont fourni : 144mg de lunaridine
201mg d'alcaloïde LBY imparfaitement pur
40mg d'alcaloïde LBZ également impur.

La purification par chromatographie sur plaque préparative a été effectuée :

- pour l'alcaloïde LBY avec, pour solvant de migration : un mélange chloroforme/éthanol 85/15, en atmosphère saturée d'ammoniac ; et pour éluant un mélange chloroforme/éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque ;
- pour l'alcaloïde LBZ, avec, pour solvant de migration : un mélange chloroforme/éthanol 90/10 en atmosphère saturée d'ammoniac et, pour éluant un mélange chloroforme/éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque.

146mg d'alcaloïde LBY ont été isolés : cristallisés dans le mélange méthanol/éther, ils ont conduit à 106mg de produit cristallisé (0,07% des alcaloïdes totaux, soit 8×10^{-4} g% de la poudre).

27mg d'alcaloïde LBZ pur ont été obtenus, qui n'ont pas pu être cristallisés (0,01% des alcaloïdes totaux, soit 16×10^{-5} g% de la poudre).

Alcaloïde LBX, 29

Le moins polaire des alcaloïdes de la lunaire (dans le mélange chloroforme/éthanol 90/10, en atmosphère saturée d'ammoniac), il cristallise du mélange méthanol/acétone.

$F = 250^{\circ}\text{C}$ avec décomposition ; $[\alpha]_D = + 201^{\circ}$ (chloroforme ; $c = 0,6$)

$\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_3$; $M^+ = 449$

<u>Analyse</u> :	calculé %	C 69,4	H 6,9	N 9,3
	trouvé %	69,6	6,9	9,1

Spectre IR (nujol) : 3330cm^{-1} (NH) ; 1730cm^{-1} (cétone) ; 1680 et 1550cm^{-1} (amides) ; 1640 et 975cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol ; $c = 10 \times 10^{-3}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ξ) :

milieu neutre : 225 (4,42) ; 303 (4,34) ; 325 (4,30) ;
milieu acide : 227 (4,42) ; 307 (4,30) ; 330 (4,33) ;
milieu alcalin : 227 (4,45) ; 303 (4,19) ; 325 (4,17) ; 387 (4,26).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,1 ppm		2H	H en 32
<u>m</u>	5,09ppm		1H	H en 2
<u>d</u>	7,6 ppm	J=15,5cps	1H	H en 14
<u>d</u>	6,2 ppm	J=15,5cps	1H	H en 15
<u>d</u>	6,4 ppm	J=15,5cps	1H	H en 28
<u>d</u>	7,03ppm		1H	H en 29
<u>d</u>	7,16ppm	J=8cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,73ppm		1H	H en 12
<u>s</u>	6,81ppm		1H	H en 9
<u>m</u>	7 à 7,3ppm		1H	H en 26

Alcaloïde LBY, 4

De polarité intermédiaire entre celle de la lunarine et celle de la numismine (dans le mélange chloroforme/éthanol 90/10 saturé en ammoniac), il cristallise du mélange méthanol/éther.

$$F = 268-273^{\circ}\text{C} ; [\alpha]_{\text{D}} = + 142^{\circ} \text{ (éthanol ; } c = 0,435)$$



<u>Analyse</u> :	calculé %	C 63,1	H 7,8	N 8,8
	trouvé %	63,0	7,5	8,8

Spectre IR (nujol): 3420-3440 cm^{-1} (OH) ; 3270-3290 cm^{-1} (NH) ; 1660 et 1550 cm^{-1} (amides) ; 1640 et 970 cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol à 95°C ; c = 10 x 10⁻³ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

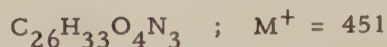
milieu neutre : 226 (4,4) ; 298 (4,33) ; 320 (4,29) ;
milieu acide : 226 (4,4) ; 302 (4,29) ; 320 (4,26) ;
milieu alcalin : (potasse méthanolique 2 N ; c = 0,037 g/l)
 295 (4,09) ; 315 (4,15)

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,58ppm		1H	H en 2
<u>d</u>	7,47ppm	J=15,5cps	1H	H en 14
<u>d</u>	6,09ppm		1H	H en 15
<u>d</u>	6,23ppm	J=15,5cps	1H	H en 28
<u>d</u>	6,85ppm		1H	H en 29
<u>d</u>	7,10ppm	J=7cps	1H	H en 11
<u>d</u>	6,72ppm		1H	H en 12
<u>s</u>	7,17ppm		1H	H en 9
<u>m</u>	9,1 ppm		1H	H en 17

Alcaloïde LBZ, 30

Produit amorphe de polarité intermédiaire entre celle de LBX et celle de la lunarine (dans le mélange chloroforme/éthanol 90/10 saturé en ammoniac).



Spectre IR (solution chloroformique) : $3270\text{-}3310\text{cm}^{-1}$ (NH) ; 1660 et 1540cm^{-1} (amides) ; 1600 et 975cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,11ppm		2H	H en 32
<u>m</u>	4,61ppm		1H	H en 2
<u>d</u>	6,3 ppm	}	1H	H en 15
<u>d</u>	7,6 ppm		1H	H en 14
<u>d</u>	6,56ppm	}	1H	H en 28
<u>d</u>	6,96ppm		1H	H en 29
<u>d</u>	6,95ppm	}	1H	H en 11
<u>d</u>	6,68ppm		1H	H en 12
<u>s</u>	7,25ppm		1H	H en 9
<u>m</u>	7 à 7,4ppm		1H	H en 26

III - ETUDE STRUCTURALE DE LA LUNARIDINE ET DE LA NUMISMINE

Lunaridine, 33

Elle est isolée des alcaloïdes totaux par chromatographie sur colonne d'alumine ; elle est éluée par CH_2Cl_2 contenant 1 à 5% de méthanol et cristallisée dans l'éthanol.

C'est le plus polaire des alcaloïdes connus de la lunaire ; elle représente 23% des alcaloïdes totaux.

$F > 265^\circ\text{C}$ (Kofler) avec décomposition ; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_3 ; \text{M}^+ = 437 ;$

$[\alpha]_D = + 267^\circ$ (éthanol à 95°C ; $c = 0,08$).

Spectre IR (nujol) : 3270cm^{-1} (NH) ; 1730cm^{-1} (cétone) ; 1675 et $1540\text{-}1580\text{cm}^{-1}$ (amides) ; 1630 et 980cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol à 95°C ; c = 8,19 x 10⁻³ g/l) : $\lambda_{\max}$ mμ (log ε) :

milieu neutre : 225 (4,33) ; épaulement à 290 (4,22) ; 297 (4,26) , 317 (4,16) ;
milieu acide : 225 (4,33) ; épaulement à 290 (4,2) ; 299 (4,25) ; 318 (4,15) ;
milieu alcalin : épaulement à 242 (4,31) ; 316 (3,93) ; 369 (4,33).

Dichroïsme circulaire (éthanol ; c = 0,140 g/l) : $\lambda_{\max}$ mμ (Δε) :

220 (-12,17) ; 246 (+4,05) ; 286 (+8,43).

Spectre de RMN (DMSO) :

<u>m</u>	5,10ppm		1H	H en 2
<u>s</u>	7,39ppm		1H	H en 9
<u>d</u>	6,14ppm	{	1H	H en 15
<u>d</u>	7,36ppm		1H	H en 14
<u>d</u>	6,48ppm	{	1H	H en 28
<u>d</u>	6,91ppm		1H	H en 29
<u>d</u>	6,80ppm	{	1H	H en 12
<u>d</u>	7,30ppm		1H	H en 11
<u>m</u>	8,2 ppm		1H	H en 17
<u>m</u>	7,96ppm		1H	H en 26

* Fusion alcaline de la lunaridine

Elle est réalisée dans un ballon en acier inoxydable. Un tube à dégagement est fixé au ballon au moyen d'un joint d'amiante : il est pourvu d'un renflement basal permettant la condensation des vapeurs, lui-même relié à un flacon-piège contenant une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 2 N afin de capter les vapeurs alcalines non condensées.

Un mélange de 2g de pastilles de potasse et de 2g de pastilles de soude, placé dans le ballon, est chauffé quelques minutes directement à la flamme de façon à chasser l'eau. Après refroidissement, on ajoute 1g de lunaridine et 2 nouveaux g. de potasse. Le ballon, raccordé au reste du montage, est chauffé progressivement au bain métallique.

Après un premier dégagement de vapeurs non condensables à température ambiante, les vapeurs condensables apparaissent sous forme d'un liquide assez visqueux, légèrement coloré en jaune. Le chauffage est arrêté lorsque le dégagement gazeux cesse (vers 360°C).

Les vapeurs condensées dans le renflement basal du tube à dégagement sont recueillies et conservées sous azote jusqu'à leur identification :

- Par chromatographie en phase gazeuse : celle-ci est réalisée dans les conditions suivantes : colonne : 6 pieds de 28% PENNWALT 223 et 4% KOH en poids (80/100 mesh) - support gaz. chrom. R. ; température : 200°C ; temps de rétention : 17 minutes pour la spermidine-témoin (0,5μl injecté - sensibilité 10 x 10²), pour le produit de dégradation de la lunaridine (0,5μl injecté - sensibilité 10 x 10²), pour le mélange spermidine-témoin + produit de dégradation de la lunaridine (0,5μl de chaque composé - sensibilité 50 x 10²).

- . Par spectrographie IR et de RMN des dérivés triacétylés : la spermidine-témoin, comme le produit de dégradation de la lunaridine, est traitée directement par l'acétate d'hydrogène, sans solvant.

Le spectre IR (solution chloroformique) du composé isolé présente les bandes caractéristiques des NH (3315cm^{-1}) et des amides ($1620\text{-}1670$ et 1520cm^{-1}).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	6,58 à 7,35ppm	2H	protons amidiques
<u>m</u>	3,3 ppm	8H	$>\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}$
<u>s</u>	2,1 ppm	3H	$>\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_3$
<u>s</u>	1,98ppm	6H	$\begin{array}{c} \text{H} \\ >\text{N} \diagup \diagdown \\ &\text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$
<u>m</u>	1,63ppm	6H	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \diagdown \\ \text{C}-\text{CH}_2-\text{C} \end{array}$

Isolunaridine

Produit amorphe ; $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_3$; $\text{M}^+ = 437$

$[\alpha]_D = + 174^\circ$ (éthanol à 96° ; $c = 0,536$)

Spectre IR (nujol) : 3270cm^{-1} (NH) ; 1730cm^{-1} (cétone) ; 1675 et $1550\text{-}1560\text{cm}^{-1}$ (amides) ; 1630 et 980cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol ; $c = 0,0139$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 224 (4,32) ; 299 (4,07) ; épaulement à 312 (4,04)
milieu acide : 224 (4,32) ; 299 (4,08) ; épaulement à 316 (4,04)
milieu alcalin : 296 (4,08) ; 316 (4,07) ; 351 (3,80)

Dichroïsme circulaire (éthanol ; $c = 0,139$ g/l) : λ_{max} m μ ($\Delta \epsilon$) :

219 (- 12,25) ; 238 (+ 2,51) ; 283 (+ 5,65).

Spectre de RMN (CDCl_3) :

<u>d</u>	7,73ppm	$J=2\text{cps}$	1H	H en 9
<u>d</u> dédoublé	7,15ppm	$\left. \begin{array}{l} J_{\text{H}9-\text{H}11}=2\text{cps} \\ J_{\text{H}11-\text{H}12}=8\text{cps} \end{array} \right\}$	1H	H en 11
<u>d</u>	6,75ppm	$J=8\text{cps}$	1H	H en 12
<u>d</u>	7,02ppm	$J=15,5\text{cps}$	1H	H en 29
<u>d</u>	6,10ppm	$J=15,5\text{cps}$	1H	H en 28
<u>d</u>	6,74ppm	$J=12,5\text{cps}$	1H	H en 14
<u>d</u>	5,85ppm		1H	H en 15
<u>m</u>	5,02ppm		1H	H en 2

* Hydrogénation catalytique de la lunaridine

200mg de lunaridine sont mis en solution dans l'éthanol à chaud. Après refroidissement, 40mg de charbon palladié à 10% sont ajoutés à cette solution.

L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant 24 h.

Le milieu réactionnel est filtré sur Hyflosupercel : l'évaporation du solvant laisse un résidu de 171mg.

Les deux produits majoritaires qui composent ce résidu sont séparés par chromatographie sur plaque de gel de silice (solvant de migration : CHCl_3 /éthanol 80/20 saturé d'ammoniac ; nombre de migrations : 2 ; éluant : CHCl_3 /éthanol 50/50 saturé d'ammoniac).

On obtient 100mg de tétrahydrolunaridine (produit le moins polaire), 22mg d'hexahydrolunaridine.

Cette dernière peut également être obtenue, seule, en milieu éthanolate, comme l'hexahydrolunaridine.

Tétrahydrolunaridine

$\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_3$; $M^+ = 441$; $[\alpha]_D = +190^\circ$ (éthanol à 96° ; $c = 0,131$)

Spectre IR (solution chloroformique) : 3290cm^{-1} (NH) ; 1720cm^{-1} (cétone) ; 1650 et 1540cm^{-1} (amides).

Spectre UV (éthanol à 95° ; $c = 13,1 \times 10^{-2}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ)

milieu neutre : 229 (3,80) ; 287 (3,52) ; épaulement à 292 (3,49)

milieu acide : 229 (3,80) ; 287 (3,51) ; épaulement à 291 (3,48)

milieu alcalin : 287 (3,55) ; épaulement à 292 (3,51)

Dichroïsme circulaire (éthanol ; $c = 0,145$ g/l) : λ_{max} m μ ($\Delta \epsilon$) :

232 (+ 4,56) ; 283 (+ 3,04)

Spectre de RMN :

<u>m</u>	4,89ppm	} $J=9\text{cps}$	1H	H en 2
<u>d</u>	6,63ppm		1H	H en 12
<u>d</u>	7,01ppm		1H	H en 11
<u>s</u> élargi	6,95ppm		1H	H en 9
<u>m</u>	5,82ppm		1H	H en 26
<u>m</u>	7,81ppm		1H	H en 17

Hexahydrolunaridine

$\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{N}_3$; $[\alpha]_D = 0$ (éthanol à 95° ; $c = 0,082$)

Spectre IR (solution chloroformique) : 3275cm^{-1} (NH) ; 1705cm^{-1} (cétone) ; 1635 et 1540cm^{-1} (amides).

Spectre UV (éthanol ; $c = 5,9 \times 10^{-2}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 230 (3,83) ; 288 (3,46)
milieu acide : 230 (3,83) ; 288 (3,46)
milieu alcalin : 252 (3,86) ; 297 (3,65) ; épaulement à 304 (3,64)

Spectre de RMN :

Sur le spectre, mal résolu, on peut localiser :

<u>s</u> élargi	6,92ppm	1H	H en 9
<u>d</u>	7 ppm	1H	H en 11
<u>d</u>	6,8 ppm	1H	H en 12

} $J=9\text{cps}$

Numismine, 34

Extraite en même temps que les autres alcaloïdes présents dans les graines de Lunaire, elle en est séparée par chromatographie sur colonne d'alumine, éluée par le mélange CH_2Cl_2 + 5 à 10% de méthanol.

Elle représente 4,5% des alcaloïdes totaux.

De polarité intermédiaire entre celle de LBY et celle de la lunaridine, elle cristallise dans l'acétone.

$\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_3$; $M^+ = 439$; $F > 270^\circ\text{C}$ avec décomposition (tube) ;

$[\alpha]_D = 0^\circ$ (éthanol à 95° ; $c = 0,8$)

Spectre IR (nujol) : 3280cm^{-1} (NH) ; 1710cm^{-1} (cétone) ; 1650 et 1525cm^{-1} (amides) ; 1620 et 975cm^{-1} (insaturation éthylénique).

Spectre UV (éthanol ; $c = 0,5 \times 10^{-2}$ g/l) : λ_{max} m μ (log ϵ) :

milieu neutre : 209 (4,44) ; 232 (4,40) ; 300 (4,30) ; 315 (4,32)
milieu acide : 212 (4,42) ; 232 (4,40) ; 304 (4,32) ; 314 (4,33)
milieu alcalin : 238 (4,20) ; 314 (3,98) ; 372 (4,34)

Spectre de RMN (solution dans le DMSO) :

<u>s</u> élargi	6,81ppm	1H	H en 9
<u>d</u> dédoublé	7,33ppm	1H	H en 11
<u>d</u>	7,08ppm	1H	H en 12

} $J_{\text{H}9-\text{H}11}=2\text{cps}$
 } $J_{\text{H}11-\text{H}12}=5\text{cps}$

<u>d</u>	7,35ppm	{	J=15,5cps	1H	H en 14
<u>d</u>	5,95ppm			1H	H en 15
<u>d</u>	6,29ppm	{	J=16cps	1H	H en 28
<u>d</u>	7,09ppm			1H	H en 29
<u>m</u>	8,72ppm			1H	H en 17
<u>m</u>	8,12ppm			1H	H en 26

* Fusion alcaline de la numismine

Réalisée à partir de 1g de numismine, dans les mêmes conditions que celles exposées ci-dessus pour la lunaridine, elle a fourni un liquide visqueux, incolore, identifié de la même façon que le produit de dégradation de la lunaridine.

* Hydrogénation de la numismine

100mg de numismine (forme blanche) sont dissous dans l'éthanol. A la solution, on ajoute 20mg de platine Adams. L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant 24 heures.

Après filtration sur Hyflosupercel, la solution est évaporée à sec : elle laisse un résidu de 91mg dont les constituants sont séparés par chromatographie sur gel de silice (solvant de migration = chloroforme/éthanol 85/15 saturé en ammoniac ; nombre de migrations : 2 ; éluant : chloroforme/éthanol 50/50 saturé d'ammoniaque).

34mg de tétrahydrinumismine sont obtenus.

Tétrahydrinumismine

Ses constantes physiques et ses spectres sont analogues à ceux de l'hexahydro-lunarine, 7.

IV- ETUDE BIOGENETIQUE DE LA LUNARINE

● Lors des essais préliminaires, nous avons recherché la lunarine dans les graines de lunaire à différents stades de la germination. Le début de la germination intervenant entre le 3ème et le 5ème jour, la lunarine a été extraite de graines germées après 8, 12 et 13 jours : dans tous les cas, la recherche a été positive.

Il restait à savoir si cette lunarine était encore ou non formée au stade de la germination :

450 graines ont été mises à germer sur coton de verre humide. Après onze jours, 62 à 68% des graines sont germés.

On leur fournit 100 μ Ci de (+)-phénylalanine ^{14}C -3. L'incorporation est arrêtée après une semaine.

Les alcaloïdes totaux sont extraits selon la technique habituelle : 28mg sont isolés.

Une chromatographie sur colonne d'alumine a permis de séparer 12mg de lunarine, cristallisés dans l'éthanol. La radioactivité, évaluée sur les premiers jets de cristallisation, s'est révélée insignifiante.

. Les plantes utilisées pour les essais suivants (de 75 à 80 par année) sont coupées au moment où les graines sont nettement visibles dans les siliques, encore vertes.

Seules les tiges portant les siliques sont conservées et placées dans des bēchers contenant le précurseur en solution aqueuse. La solution radioactive absorbée, de l'eau distillée est ajoutée pour maintenir les plantes en survie pendant 8 jours.

Après ce délai, les siliques sont séparées et broyées. La poudre grossière est traitée selon la technique habituelle d'extraction des alcaloïdes totaux. Seule modification apportée : après distillation de l'éthanol du liquide d'épuisement acide et large dilution par de l'eau distillée, le nouveau dégraissage par l'éther de pétrole est suivi d'une extraction par l'éther pour éliminer la chlorophylle apportée par les siliques.

La lunarine a été séparée soit par chromatographie sur colonne d'alumine selon la technique habituelle, soit par chromatographie sur plaque épaisse de silice (lots marqués d'une * dans le tableau ci-dessous).

	Poids de plantes	Alcaloïdes totaux	Lunarine extraite
<u>1^{er} essai</u> (été 1969) (+) phénylalanine ^{14}C -3 1 ^{er} lot 2 ^e lot	Plantes fraîches 450 g 460 g	150 mg 200 mg	12,4 mg * 12,3 mg
<u>2^{ème} essai</u> (été 1969) (+) tyrosine ^{14}C -3 1 ^{er} lot 2 ^e lot	Plantes fraîches 230 g 300 g	215 mg 147mg $\rightarrow$ 30mg	4,4 mg 3,8 mg *
<u>3^{ème} essai</u> (été 1970) ^{14}C -L-phénylalanine (U) L-phénylalanine- ^3H -4 (n)	Plantes congelées 806 g	4,28 g	309 mg

Les valeurs indiquées dans ce tableau appellent quelques remarques :

- la congélation des plantes lors du troisième essai a permis d'éliminer une partie de l'eau contenue dans les plantes et, de ce fait, de faciliter les opérations de broyage et d'extraction ;
- les chiffres d'alcaloïdes totaux pour les deux premiers essais sont probablement très supérieurs aux quantités réelles d'alcaloïdes, en raison de la présence persistante de chlorophylle : un traitement supplémentaire par l'éther des alcaloïdes du deuxième lot "alimenté" en tyrosine a fait tomber le taux de 147 à 30mg, à partir desquels les 3,8mg de lunarine ont été séparés.

Ce traitement supplémentaire a été repris lors du troisième essai.

Après évaluation de la radioactivité de la lunarine brute, pure à la chromatographie sur couche mince, des dilutions convenables avec de la lunarine non-radioactive ont été opérées, et les produits dilués recristallisés jusqu'à radioactivité constante (3 à 5 recristallisations dans l'éthanol).

La détermination des radioactivités a été faite en milieu liquide sur compteur Nuclear Chicago Mark I, modèle 6860, équipé d'un dispositif de standardisation externe. Le comptage des échantillons des deux premiers essais a été réalisé dans le dioxanne scintillant, celui des échantillons du troisième essai dans le toluène scintillant.

Les résultats obtenus sont réunis dans les deux tableaux suivants :

	Quantité de précurseur marqué	Quantité de lunarine extraite	% incorporation
<u>1^{er} essai</u> (été 1969)			
(+) phénylalanine ^{14}C -3			
1 ^{er} lot	200 μCi	12,4 mg	0,006 %
2 ^e lot	300 μCi	12,3 mg	0,03 %
<u>2^{ème} essai</u> (été 1969)			
(+) tyrosine ^{14}C -3			
1 ^{er} lot	100 μCi	4,4 mg	$3 \cdot 10^{-4}$ %
2 ^e lot	100 μCi	3,8 mg	$9 \cdot 10^{-4}$ %
<u>3^{ème} essai</u> (été 1970)			
^{14}C -L-phénylalanine (U)	300 μCi	309 mg	0,11 % ^{14}C
L-phénylalanine- ^3H -4 (n)	3 mCi		0,04 % ^3H

V - DEGRADATIONS DES PRINCIPAUX ALCALOÏDES DE LA LUNAIRE

Hydrolyse alcaline

. La réduction par le borohydrure de sodium, puis l'hydrogénation catalytique de 1g de lunarine, 1, selon les techniques précédemment décrites (cf.p. 87, 92), fournissent 1g des tétrahydrolunarins I et II, 20a et 20b.

. Le mélange d'alcools hydrogénés est solubilisé dans 60ml d'éthanol ; à cette solution, on ajoute 15ml d'une solution aqueuse de soude, environ 10 N. Le milieu réactionnel, placé dans une bombe, est porté à 160-180°C pendant 16 à 18 h.

Après refroidissement et dilution par 300ml d'eau salée, on extrait par le chloroforme, ce qui permet d'éliminer les substances aminées éventuellement formées à partir de la spermidine. Après acidification par 30ml d'acide chlorhydrique au 1/2, on procède à une nouvelle extraction par le chloroforme.

L'évaporation du solvant laisse un résidu (laque jaune pâle) de 490mg (52 et 53) qui est remis en solution dans le méthanol.

. A cette solution, maintenue à la température du bain de glace, on ajoute un excès d'une solution étherée de diazométhane. Après quinze minutes, on laisse le milieu réactionnel revenir à la température ambiante. Après une heure, l'excès de diazométhane est détruit par l'acide acétique. Le mélange réactionnel est dilué par de l'eau salée, alcalinisé par Na_2CO_3 avant d'être extrait par de l'éther.

Après évaporation du solvant, il reste 505mg (54 et 55).

. 186mg du mélange d'alcools précédent sont solubilisés dans 5ml de diméthylformamide ; on leur ajoute 186mg d'anhydride chromique mis en solution dans 5ml de diméthylformamide et III gouttes d'acide sulfurique concentré.

Après 24 h., on jette le milieu réactionnel dans de l'eau alcalinisée par 2-3% d'ammoniaque, puis on extrait par l'éther. Après lavages par de l'eau alcaline, puis de l'eau distillée, la phase organique est séchée et évaporée à sec : on obtient 138mg de 32, purifiés par chromatographie sur plaque de gel de silice (solvant de migration : éther ; éluant : chloroforme). Finalement, 128mg de produit pur sont séparés (56) ; $[\alpha]_D = + 154^\circ$ (CHCl_3 ; $c = 0,875$) ; $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$; $M^+ = 360$.

<u>Analyse</u> :	calculé %	C 66,6	H 6,7
	trouvé %	66,2	6,7

Spectre IR (solution chloroformique) : 1735-1750 cm^{-1} (esters) ; 1715-1730 cm^{-1} (cétone) ; les deux bandes étant plus ou moins confondues.

Spectre de RMN :

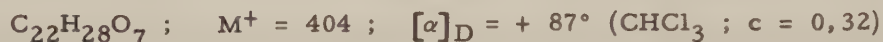
<u>s</u>	3,66ppm	3H	-CH ₃ en 20 ou 21
<u>s</u>	3,67ppm	3H	-CH ₃ en 20 ou 21
<u>t</u>	4,85ppm	1H	H en 2
<u>s</u> élargi	6,95ppm	1H	H en 9

<u>d</u> dédoublé	6,69ppm	$\begin{cases} J_{H9-H12}=1\text{cps} \\ J_{H11-H12}=7,5\text{cps} \end{cases}$	1H	H en 12
<u>d</u> dédoublé	7,04ppm	$\begin{cases} J_{H11-H12}=7,5\text{cps} \\ J_{H9-H11}=2\text{cps} \end{cases}$	1H	H en 11

Traités dans des conditions analogues, 500mg de lunaridine ont fourni 200mg du mélange de diacides 52 + 53, 205mg du mélange des esters 54 + 55 et 170mg du composé 56 (152mg après purification sur plaques de gel de silice).

A partir de 300mg de lunarinol I, 3, on obtient successivement 133mg du composé 52 et 141mg du composé 54.

Celui-ci est purifié par chromatographie sur plaque de gel de silice (solvant de migration : éther ; mélange éluant : chloroforme/méthanol 95/5) ; les 119mg séparés sont acétylés par l'anhydride acétique dans la pyridine. On obtient ainsi 116mg du composé 14 :



Spectre IR (en solution chloroformique) : large bande ester entre 1715 et 1750cm⁻¹.

Spectre de RMN :

<u>s</u>	1,96ppm		3H	H en 23
<u>s</u>	3,61ppm		3H	H en 20 ou 21
<u>s</u>	3,67ppm		3H	H en 20 ou 21
<u>q</u>	4,53ppm	$\begin{cases} J_1=6\text{cps} \\ J_2=8\text{cps} \end{cases}$	1H	H en 2
<u>m</u>	4,78ppm		1H	H en 4
<u>d</u> dédoublé	6,74ppm	$\begin{cases} J_{H9-H12}=1\text{cps} \\ J_{H11-H12}=8\text{cps} \end{cases}$	1H	H en 12
<u>d</u> dédoublé	7,04ppm	$\begin{cases} J_{H9-H11}=2\text{cps} \\ J_{H11-H12}=8\text{cps} \end{cases}$	1H	H en 11
<u>m</u>	6,91ppm		1H	H en 9

A partir de 140mg du lunarinol II, 4, on obtient 63mg du diacide, 53, puis 65mg du diester 55. Celui-ci, purifié comme le composé 54, est acétylé de la même façon. Le dérivé O-acétylé 13 qui en résulte présente les caractères suivants :



Spectre IR (en solution chloroformique) : large bande ester entre 1715 et 1750cm⁻¹.

Spectre de RMN :

<u>s</u>	2,05ppm		3H	H en 23
<u>s</u>	3,64ppm		3H	H en 20 ou 21
<u>s</u>	3,66ppm		3H	H en 20 ou 21
<u>t</u>	4,56ppm	J=5,5cps	1H	H en 2
<u>m</u>	5,02ppm		1H	H en 4
<u>d</u> dédoublé	6,70ppm	$\left\{ \begin{array}{l} J_{H9-H12}=1\text{cps} \\ J_{H11-H12}=8\text{cps} \end{array} \right.$	1H	H en 12
<u>d</u> dédoublé	7,01ppm	$\left\{ \begin{array}{l} J_{H9-H11} \\ J_{H11-H12}=8\text{cps} \end{array} \right.$	1H	H en 11
<u>m</u>	6,90ppm		1H	H en 9

VI SYNTHESE DE LA LUNARINEA - Synthèse du système hexahydrodibenzofuranne substitué -1) - Ester méthylique de l'acide p. hydroxyphényl-3 propionique, 58

9,41g de l'acide 57 sont dissous dans 300ml d'éther. On ajoute un excès de diazométhane en solution étherée.

Après 1/2 heure, l'excès de diazométhane est détruit par de l'acide acétique. Après évaporation sous vide, il reste 10,2g d'un liquide incolore.



Spectre IR (sur produit pur) : 3400cm^{-1} (OH) ; $1700-1745\text{cm}^{-1}$ (ester).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	entre	2,4 et 3,1ppm	4H	H en 2 et 3
<u>s</u>		3,68ppm	3H	-COOMe
<u>m</u>		6,12ppm	1H	HO en 4'
<u>d</u>		6,76ppm	2H	H en 3' et 5'
<u>d</u>		7,06ppm	2H	H en 2' et 6'

2) - Céto-4bis [carboxyméthyl-2-éthyl] 7,10-tétrahydro-2,7,3,4-dibenzofuranne, 59. Méthode chimique

3,7g de l'ester méthylique 58 et 4,24g de Na_2CO_3 sont agités vigoureusement avec 100ml d'eau. On ajoute goutte à goutte, en 45 minutes, 9,9g de ferricyanure de K dissous dans 100ml d'eau. On opère à 0°C . Après 3 h. 1/2, on extrait par le CHCl_3 . La phase organique est séchée et évaporée sous pression réduite. On obtient 3,87g de résidu.

. Méthode enzymatique

A 100ml d'une solution tampon-phosphate 0,2 M, on ajoute 4ml de solution enzymatique (activité: 0,12 unité/ml) et 1ml H_2O_2 à 20 vol. En opérant à température ambiante et sous agitation magnétique, on ajoute goutte à goutte 10,2g d'ester méthylique 58 dissous dans 40ml d'acétone.

L'agitation est maintenue 4 h. On extrait par le $CHCl_3$: l'évaporation du solvant $\rightarrow$ 14,055g.

Quelque soit le mode de préparation, le produit de couplage attendu est séparé sur plaques préparatives de gel de silice (solvant de migration : $CHCl_3/MeOH$ 200/5) après une première purification du mélange par filtration sur colonne de silice (éluant : $CHCl_3$).

La préparation par voie chimique fournit finalement 0,541g du composé 59, c'est-à-dire 14%; par voie enzymatique on en isole 0,121g, soit 11%. Le produit de couplage 59 se présente sous forme d'une huile incolore, qui cristallise du mélange benzène/hexane.

$$F = 172-174^\circ C \text{ (tube)} ; C_{20}H_{22}O_6 ; M^+ = 358.$$

Spectre IR (sur produit huileux) : $1720cm^{-1}$ (esters) ; $1680cm^{-1}$ (cétone $\alpha\beta$ insaturée).

Spectre de RMN :

<u>m</u>	entre 2,3 et 3ppm		10H	H en 3, 14, 15, 17, 18
<u>s</u>	3,67ppm		3H	} H en 20 et 21 (-COO-CH ₃)
<u>s</u>	3,68ppm		3H	
<u>m</u>	4,82ppm		1H	H en 2
<u>d</u>	6,02ppm	$J_{H5-H6} = 10,5cps$	1H	H en 5
<u>d</u> dédoublé	6,44ppm	$J_{H5-H6} = 10,5cps$ $J_{H6-H2} = 2cps$	1H	H en 6
<u>d</u>	6,74ppm	$J_{H11-H12} = 8,5cps$	1H	H en 12
<u>d</u>	7,05ppm	$J_{H11-H12} = 8,5cps$ $J_{H9-H11} = 2cps$	1H	H en 11
<u>d</u>	7,06ppm	$J_{H9-H11} = 2cps$	1H	H en 9

3) - Céto-4-bis [carbométhyl-2-éthyl]-7,10-hexahydro-2,3,4,5,6,7 dibenzofuranne, 60

450mg du composé 59 sont dissous dans 30ml d'éthanol. On ajoute à la solution 75mg de charbon palladié.

L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant 24 heures. Après filtration du catalyseur, le solvant est évaporé sous pression réduite : il laisse 453mg d'une huile jaune.

Le produit attendu, majoritaire, est séparé par chromatographie sur plaques de gel de silice (solvant de migration : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 100/3).

On obtient ainsi 360mg de produit pur, 60, identique au produit de dégradation 56.

4) - Hydrolyse de 60 $\rightarrow$ 61

300mg du diester 60 sont dissous dans 50ml de potasse éthanolique à 4%. Le contact est maintenu à température ordinaire pendant 48 h. Le milieu réactionnel est alors dilué par 300ml d'eau distillée, acidifié par $\text{HCl} \sim \text{N}$ et extrait par l'éther.

La solution organique est séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite $\rightarrow$ 271mg de 61, cristallisé dans le mélange EtOH/eau.

$$F = 160^\circ\text{C (tube)} ; \text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_6 ; M^+ = 332$$

Spectre IR (nujol) : 1700cm^{-1} (cétone).

Spectre de RMN :

<u>t</u>	4,86ppm	$J=3,5\text{cps}$	1H	H en 2
<u>d</u> dédoublé	6,73ppm	$\left\{ \begin{array}{l} J_{\text{ortho}}=9,5\text{cps} \\ J_{\text{para}}=1,5\text{cps} \end{array} \right.$	1H	H en 12
<u>s</u> élargi	7 ppm		1H	H en 9
<u>d</u> dédoublé	7,04ppm	$\left\{ \begin{array}{l} J_{\text{ortho}}=9,5\text{cps} \\ J_{\text{méta}}=2\text{cps} \end{array} \right.$	1H	H en 11
<u>m</u>	9,05ppm		2H	H en 19 et 20 (-COOH)

B) - Protection de la spermidine -

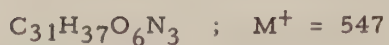
$\text{N}_a, \text{N}_b, \text{N}_c$ -tribenzyloxycarbonyl-spermidine, 64

A une solution de 1ml de spermidine dans 20ml de chloroforme, on ajoute 1g de carbonate de sodium anhydre et 3ml de chlorocarbonate de benzyle. On opère sous azote et à 0°C .

Après 25 minutes, on ajoute 5ml de soude 4N. Après un contact de 5 minutes, on extrait par le chloroforme.

L'évaporation du solvant laisse 2,6g d'une huile, homogène en chromatographie sur couche mince (solvant de migration = chloroforme/méthanol 95/5).

Les essais de cristallisation ont été infructueux.



Spectre de RMN :

<u>s</u> élargi	7,13ppm	15H	benzéniques
<u>s</u>	5,10ppm	6H	-CH ₂ -φ
<u>m</u>	3,2 ppm	8H	-CH ₂ -N
<u>m</u> entre	1 et 2ppm	6H	C-CH ₂ -C

N_a,N_c-diméthoxycarbonyl, N_b-benzyloxycarbonyl-spermidine, 65

500mg du composé précédent, 64, mis en solution dans la soude méthanolique N, sont chauffés à reflux pendant 24 h.

Après dilution par de l'eau salée, on extrait par le chloroforme. L'évaporation du solvant laisse un résidu de 300mg : le composé attendu est séparé de l'alcool benzylique qui l'accompagne par chromatographie sur plaques de gel de silice (solvant de migration : chloroforme/méthanol 98/2).

On obtient finalement un produit huileux.



Spectre de RMN :

<u>s</u> élargi	7,35ppm	5H	benzéniques
<u>s</u> élargi	5,13ppm	2H	-CH ₂ -φ
<u>s</u>	3,63ppm	6H	OCH ₃
<u>m</u> entre	2,9 et 3,5ppm	8H	-C-CH ₂ -N
<u>m</u> entre	1,3 et 2ppm	6H	-C-CH ₂ -C-

N_a,N_c-diméthoxycarbonyl-spermidine, 66

300mg du composé précédent, 65, sont dissous dans 10ml de méthanol. A cette solution, on ajoute III gouttes d'acide chlorhydrique concentré et 100mg de charbon palladié à 10%. L'hydrogénation est conduite à température et pression ordinaires pendant trois heures et demie.

Le catalyseur est séparé par filtration sur hyflosupercel et le solvant évaporé. On obtient 170mg d'un produit qui cristallise dans le mélange méthanol/acétone.



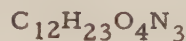
Spectre de RMN :

<u>s</u>		3,63ppm	6H	OCH ₃
<u>m</u>	entre	2,95 et 3,45ppm	4H	C-CH ₂ -N-C=O
<u>m</u>	entre	2,4 et 2,8ppm	4H	C-CH ₂ -N-CH ₂ -C
<u>m</u>	entrée	1,2 et 1,9ppm	6H	C-CH ₂ -C

Méthoxycarbonyl-1[n-butylamino (N-méthoxycarbonyl)]-3 perhydropyrimidine, 68

170mg de chlorhydrate de 66 sont mis en solution dans du formol aqueux à 40%, additionné de quelques gouttes d'acide acétique. On ajoute un excès de borohydrure de sodium et on maintient le contact pendant deux heures.

L'extraction par le chloroforme fournit 148mg d'un produit qui est purifié par filtration sur une colonne d'alumine dans le benzène. On obtient finalement 82mg de produit pur.

Spectre de RMN :

<u>s</u>		4,11ppm	2H	N-CH ₂ -N
<u>s</u>		3,71ppm	}	OCH ₃
<u>s</u>		3,66ppm		
<u>m</u>	entre 2 et 3,5ppm		8H	C-CH ₂ -N
<u>m</u>	entre 1,1 et 1,9ppm		6H	C-CH ₂ -C

C) - Méthode des esters actifs -1) - Préparation de l'ester "actif", 69

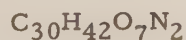
Sa fonction cétone, réduite en alcool par le borohydrure de sodium, le diacide 61 est traité par l'anhydride acétique dans la pyridine.

A 310mg (0,9millimole) de ce dérivé O-acétylé, mis en solution dans le chlorure de méthylène, on ajoute 200mg (1,8millimole) de triéthylamine puis, goutte à goutte, une solution contenant 170mg (1,8millimole) de chloroformiate. On opère à 0°C.

Après 15 minutes, on ajoute une solution chlorométhylénique d'hydroxy-1 pipéridine (2 millimoles).

Après 2 heures, le mélange réactionnel est lavé successivement par de l'eau, de l'acide chlorhydrique 2 N, de l'eau bicarbonatée, puis de l'eau.

Le solvant évaporé, il reste 500mg d'un produit huileux, homogène à la chromatographie sur couche mince.



<u>Analyse</u> :	calc. %	C 66,4	H 7,8	N 5,1
	tr. %	65,5	7,6	4,8

Produit instable ne donnant pas de pic moléculaire en spectrométrie de masse.

2) - Condensation de l'ester "actif" avec la spermidine -

A une solution de 830mg de diester 69 dans 80ml de tétrahydrofurane anhydre, on ajoute 600mg de spermidine. Le mélange est chauffé à reflux pendant 20 heures. Après distillation du solvant, le résidu est repris par 200ml de chloroforme ; la solution organique est lavée deux fois par 100ml d'eau distillée saturée de chlorure de sodium.

L'évaporation du solvant laisse 840mg d'un résidu qui est purifié par chromatographie sur plaques de gel de silice (solvant de migration : chloroforme/éthanol 75/25 saturé en ammoniac ; éluant : chloroforme/éthanol 80/20).

On obtient finalement 140mg du composé 70, directement mis en solution dans de la soude méthanolique 0,2 N ; cette solution est chauffée à reflux pendant 1 heure.

Après dilution par de l'eau saturée de chlorure de sodium, le mélange réactionnel est extrait par le chloroforme. On obtient finalement 84mg de l'alcool 71 (rendt. : 12,5%).



Spectre IR (solution chloroformique) : 3290cm^{-1} (NH) ; $1650\text{-}1660\text{cm}^{-1}$ et 1520cm^{-1} (amides)

Spectre de RMN :

<u>q</u>	4,5ppm	1H	H en 2
<u>m</u>	3,79ppm	1H	H en 4
<u>m</u>	5,86ppm	1H	H en 26
<u>m</u>	7,71ppm	1H	H en 17
<u>s</u>	6,94ppm	1H	H en 9
<u>d</u>	6,70ppm	1H	H en 12
<u>d</u>	6,99ppm	1H	H en 11

L'oxydation chromique de l'alcool 71, selon la technique déjà citée (cf. p. 115) conduit à un composé en tous points comparable à la tétrahydrolunaridine, 72, décrite ci-dessus (cf. p. 109).

=====

=====

=====

=====

BIBLIOGRAPHIE

- (1) E. REEB, Journal de Pharmacie d'Alsace-Lorraine, mai 1908.
- (2) E. REEB, Nouveaux Remèdes, 1910, 26, 481.
- (3) E. HAIRES, Bull. Acad. Roy. Belg., 1909, p. 1042.
- (4) E. HAIRES, Svensk. Farmac. Tidskrift., 1909.
- (5) E. HAIRES, Chem. Zeutr., 1910, 1, 456.
- (6) A. KJAER, J. CONTI, Acta Chem. Scand., 1953, 7, 1011.
- (7) G. BERTRAND, L. SILBERSTEIN, C. R. Acad. Agr. France, 1941, 27, 24 ;
(CA 1944, 38, 5260 7).
- (8) E. STEINEGGER, T. REICHSTEIN, Pharm. Acta Helv., 1947, 22, 258 ;
(CA 1949, 43, 1047c).
- (9) O.R. HANSEN, Acta Chem. Scand., 1947, 1, 656.
- (10) H.G. BOIT, Ber., 1954, 87, 1082.
- (11) M.-M. JANOT et J. LE MEN, Bull. Soc. Chim. Fr., 1956, p. 1840.
- (12) P. POTIER, J. LE MEN et M.-M. JANOT, Bull. Soc. Chim. Fr., 1959,
p. 201.
- (13) C. POUPAT, B. RODRIGUEZ, H.-P. HUSSON, P. POTIER et M.-M. JANOT,
C. R. Acad. Sci., 1969, 269, 335.
- (14) P. POTIER et J. LE MEN, Bull. Soc. Chim. Fr., 1959, p. 456.
- (15) P. BLADON, R. IKAN, F.S. SPRING et A.D. TAIT, Tetrahedron Letters,
1959, 9, 18.
- (16) P. POTIER, J. LE MEN, M.-M. JANOT et P. BLADON, Tetrahedron
Letters, 1960, 18, 36.

- (17) P. POTIER, Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris 1960.
- (18) P. POTIER, J. LE MEN, M.-M. JANOT, P. BLADON, A.G. BROWN et C.S. WILSON, *Tetrahedron Letters*, 1963, 5, 293.
- (19) C. TAMURA, G.A. SIM, J.A.D. JEFFREYS, P. BLADON et G. FERGUSON, *Chem. Comm.*, 1965, 20, 485.
- (20) J.A.D. JEFFREYS et G. FERGUSON, *J. Chem. Soc.*, 1970, 5B, 826.
- (21) C. TAMURA et G.A. SIM, *J. Chem. Soc.*, 1970, 5B, 991.
- (22) P.O. LARSEN, *Acta Chem. Scand.*, 1962, 16, 1511.
- (23) P.O. LARSEN, *Acta Chem. Scand.*, 1965, 19, 1071.
- (24) P.O. LARSEN, *Acta Chem. Scand.*, 1967, 21, 1592.
- (25) K.L. MIKOLAJCZAK, T.K. MIWA, F.R. EARLE, L.A. WOLFF et Q. JONES, *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 1961, 38, 678.
- (26) R.D. HARLOW, C. LITCHFIELD, R. REISER, *Lipids*, 1966, 1 (3), 216.
- (27) P. BLADON, M. CHAIGNEAU, M.-M. JANOT, J. LE MEN, P. POTIER et A MALERA, *Tetrahedron Letters*, 1961, p. 321.
- (28) E.W. WARNHOFF, dans *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, communication personnelle d'une revue à paraître.
- (29) S. HUNECK, *Naturwiss.*, 1962, 49 (10), 233.
- (30) H.-P. HUSSON, C. THAL, P. POTIER et E. WENKERT, *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 442.
- (31) E.B. WOMACK, J. McWHIRTER, *Org. Synth. Coll.*, 1955, 3, 714.
- (32) P.V. DEMARCO, E. FARKAS, D. DODDRELL, B.L. MYLARI et E. WENKERT, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1968, p. 5480.
- (33) A. HOREAU, *Tetrahedron Letters*, 1961, 15, 506.
- (34) A. HOREAU, *Tetrahedron Letters*, 1962, 21, 965.
- (35) A. HOREAU et H.B. KAGAN, *Tetrahedron*, 1964, 20, 2431.
- (36) J.C. GRAMAIN, H.-P. HUSSON et P. POTIER, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1969, 10, 3585.
- (37) R. STOERMER, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1909, 42, 4865.
- (38) R. STOERMER, *Ber.*, 1911, 44, 637.
- (39) A. MANGINI, F. MONTANARI, *Gazz. Chim. Ital.*, 1958, 88, 1081.
- (40) C. SANDRIS, *Tetrahedron*, 1968, 24, 3569.
- (41) A.D. COHEN, N. SHEPPARD, J.J. TURNER, *Proc. Chem. Soc.*, 1958, p. 4 ; M. KARPLUS, *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, p. 11.
- (42) E.O. BISHOP et R.E. RICHARDS, *Mol. Phys.*, 1960, 3, 114.
- (43) G.P. NEWSOROFF, S. STERNHELL, *Austr. J. Chem.*, 1968, 21, 747.
- (44) D.H.R. BARTON, A.M. DE FLORIN et O.E. EDWARDS, *J. Chem. Soc.*, 1956, p. 530.
- (45) A. PICTET et T. SPENGLER, *Ber.*, 1911, 44, 2030.
- (46) W. ESCHWEILER, *Chem. Ber.*, 1905, 38, 880.

- (47) A.I. SCOTT, *Quart. Rev.*, 1965, 1 → 35.
- (48) R. PUMMERER, E. FRANKFURTER, *Ber.*, 1914, 47, 1472 ;
R. PUMMERER, *Ber.*, 1919, 52, 1404.
- (49) C.H. VANETTEN, R.W. MILLER, *Econ. Botany*, 1963, 17 (2), 107.
- (50) L. BINET, *Biologie Médicale*, 1964, 53 (1), 5.
- (51) H.T. CLARKE, H.B. GILLEPSIE et J.Z. WEISHAUSS, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1933, 55, 4571.
- (52) W.L. CARRICK, G.L. KARAPINKA et G.T. KWIATKOWSKI, *J. Org. Chem.*, 1969, 34 (8), 2388.
- (53) W.W. WESTERFELD, C. LOWE, *J. Biol. Chem.*, 1942, 145, 463.
- (54) R. GRANGER et J.P. GIRARD, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1965, p. 1704.
- (55) W.G. DAUBEN et E. HOERGER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1951, 73, 1504.
- (56) A. PAVIA, F. WINTERNITZ et R. WYLDE, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1966, 8, p. 2506.
- (57) C.G. HAYNES, A.H. TURNER et W.A. WATERS, *J. Chem. Soc.*, 1956, p. 2823.
- (58) O.L. CHAPMAN et R.W. KING, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1964, 86, 1256.
- (59) R. PUMMERER, D. MELAMED, H. PUTTFARCKEN, *Ber.*, 1922, 55B, 3116.
R. PUMMERER, H. PUTTFARCKEN et P. SCHOPFLOCHER, *Ber.*, 1925, 58B, 1808.
- (60) H. TABOR et C.W. TABOR, *Pharmacol. Rev.*, 1964, 16, 245.
- (61) H.F. LINSKENS, A.S.L. KOCHUYT, A. SO, *Planta*, 1968, 82, 111.
- (62) N. BAGNI, C.M. CALDARERA, G. MORUZZI, *Experientia*, 1967, 23, 139.
- (63) S. COCUCCI et N. BAGNI, *Life Sci.*, 1968, 7, 113.
- (64) N. BAGNI, *Giorn. Bot. Ital.*, 1967, 101, 81 ; *Giorn. Bot. Ital.*, 1968, 102, 67.
- (65) T.A. SMITH, *Phytochem.*, 1970, 9 (7), 1479.
- (66) W. DIETSCH, C.H. EUGSTER, *Chimia Aarau*, 1960, 14, 353.
C. MAYER, W. TRUEB, J. WILSON, C.H. EUGSTER, *Helv. Chim. Acta*, 1968, 51, 661.
- (67) C.L. GREEN, C. MAYER, C.H. EUGSTER, *Helv. Chim. Acta*, 1969, 52, 673.
- (68) K. WIESNER et D.E. ORR, *Tetrahedron Letters*, 1960, 16, 11.
- (69) M.M. BADAWI, A. GUGGISBERG, P. Van den BROEK, M. HESSE et H. SCHMID, *Helv. Chim. Acta*, 1968, 51, 1813.
- (70) H.J. VEITH, M. HESSE et H. SCHMID, *Helv. Chim. Acta*, 1970, 53 (6), 1355.
- (71) A. RAINA, *Acta Chem. Scand.*, 1962, 16 (10), 2463 ; *Acta Chem. Scand.*, 1964, 18 (9), 2188.
- (72) D.H. RUSSEL, S.M. SNYDER et V.J. MEDINA, *Life Sci.*, 1969, 8 (24), 1247 (CA 72, 76183).
- (73) H. TABOR, S.M. ROSENTHAL et C. TABOR, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1957, 79, 2978.

- (74) R.C. GREENE, J. Amer. Chem. Soc., 1957, 79, 3929.
- (75) H. TABOR, S.M. ROSENTHAL et C.W. TABOR, J. Biol. Chem., 1958, 233, 907.
- (76) A.E. PEGG, H.G. WILLIAMS-ASHMAN, J. Biol. Chem., 1969, 244 (3), 682.
- (77) J. JÄNNE, A. RAINA et M. SIIMES, Biochim. & Biophys. Acta, 1968, 166 (2), 419.
- (78) D.R. MORRIS, A.B. PARDEE, J. Biol. Chem., 1966, 241 (13), 3129.
- (79) G. GUROFF, J.W. DALY, D.M. JERINA, J. RENSON, B. WITKOP et S. UDENFRIEND, Science, 1967, 157, 1524.
- (80) D. JERINA, G. GUROFF et J. DALY, Arch. Biochem. Biophys., 1968, 124, 612.
J. DALY, D. JERINA et B. WITKOP, Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 517.
- (81) D.M. JERINA, J.W. DALY et B. WITKOP, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 6523.
- (82) D.M. JERINA, J.W. DALY, B. WITKOP, P. ZALTMAN-NIRENBERG, S. UDENFRIEND, J. Amer. Chem. Soc., 1968, 90, 6525.
- (83) J. DALY et D. JERINA, Arch. Biochem. Biophys., 1969, 134, 266.
- (84) D.W. RUSSELL, E.E. CONN, A. SUTTER et H. GRISEBACH, Biochim. & Biophys. Acta, 1968, 170, 210.
- (85) M.H. ZENK, Z. Pflanzenphysiol., 1967, 57, 477.
- (86) A. SUTTER et H. GRISEBACH, Phytochem., 1969, 8, 101.
- (87) N. AMRHEIN et M.H. ZENK, Phytochem., 1969, 8, 107.
- (88) L. NOVER et M. LUCKNER, FEBS Letters, 1969, 3 (4), 292.
- (89) S.A. BARKER, J.S. BRIMACOMBE, A.B. FOSTER, D.H. WHIFFEN et G. ZWEIFEL, Tetrahedron, 1959, 7, 10.
M. TICHY, Advances in Organic Chemistry, 1965, vol. 5, p. 115.
- (90) J.W. DALY et D.M. JERINA, Biochim. & Biophys. Acta, 1970, 208, 340.
- (91) H. PLIENINGER, R. FISCHER, G. KEILICH et H.D. ORTH, Liebigs Ann. Chem., 1961, 642, 214.
- (92) A.D. TAIT, Communication personnelle.
- (93) B.O. HANDFORD, J.H. JONES, G.T. YOUNG et T.F.N. JOHNSON, J. Chem. Soc., 1965, p. 6814.

Vu et approuvé :

Orsay, le 4 Mai 1971

Le Vice-Président de l'Université

M. STEINBERG

